
**Die Auswirkung myeloider
Suppressorzellen auf den Therapieerfolg
einer aktiv-spezifischen Immuntherapie
am Beispiel des malignen Melanoms**

Peter Rose

München 2019



Aus der Abteilung für Thoraxchirurgie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. med. Rudolf Hatz

**Die Auswirkung myeloider Suppressorzellen auf den Therapieerfolg
einer aktiv-spezifischen Immuntherapie am Beispiel des malignen
Melanoms**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Peter Rose

aus

Belovodskoe
Kirgisistan

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

| | |
|---|---|
| Berichterstatter: | Prof. Dr. med. Hauke Winter |
| Mitberichterstatter: | Prof. Dr. Carola Berking PD Dr. Robert Kammerer PD Dr. Robert Besch |
| Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: | Dr. rer. nat. Natasja van den Engel |
| Dekan: | Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel |

| | |
|-----------------------------|------------|
| Tag der mündlichen Prüfung: | 14.11.2019 |
|-----------------------------|------------|

Meinen Eltern und Kathrin.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1. | <i>Einleitung</i> | 8 |
| 1.1 | Die Elemente des Immunsystems | 9 |
| 1.2 | Die Geschichte der Tumorimmunologie | 10 |
| 1.3 | Die drei Phasen des Immunoediting | 10 |
| 1.3.1 | Eliminierung | 10 |
| 1.3.2 | Equilibrium | 11 |
| 1.3.3 | Escape | 12 |
| 1.4 | Tumorstroma und tumorinfiltrierende Leukozyten | 12 |
| 1.4.1 | MDSC | 14 |
| 1.4.1.1 | Ursprung und Begriffsklärung | 14 |
| 1.4.1.2 | Phänotypische Charakterisierung der MDSC-Subtypen | 15 |
| 1.4.1.3 | Expansion, Aktivierung und Suppressivität der MDSC | 15 |
| | a) Expansion und Aktivierung von MDSC | 17 |
| | b) Suppressiv Funktion der MDSC | 19 |
| 1.5 | Immuntherapie gegen Krebs | 20 |
| 1.5.1 | Aufbau einer Immunität gegen den Tumor | 21 |
| 1.5.2 | Arten der Immuntherapie | 22 |
| 1.5.2.1 | Aktive Immuntherapie | 22 |
| 1.5.2.2 | Passive Immuntherapie | 23 |
| 1.6 | Einführung in das LRAST-Behandlungsschema | 23 |
| 2. | <i>Ziele der Doktorarbeit</i> | 26 |
| 3. | <i>Material und Methoden</i> | 27 |
| 3.1 | Material | 27 |
| 3.1.1 | Mausstämme | 27 |
| 3.1.2 | Tumorzelllinien | 27 |
| 3.1.3 | Verbrauchsmaterial für Zellkultur, Labor und Tierversuche | 28 |
| 3.1.4 | Lösungen, Medien und biologische Reagenzien für die Zellkultur | 29 |
| 3.1.5 | Sonstige Chemikalien | 30 |
| 3.1.6 | Rezepturen für Lösungen und Puffer | 30 |
| 3.1.7 | Zusätzliches für die Durchflusszytometrie | 31 |
| 3.1.8 | Cytokine (IFN- γ) Release Assay und IFN- γ - ELISA | 31 |
| 3.1.9 | Laborgeräte | 32 |
| 3.1.10 | Antikörper | 33 |
| 3.1.11 | MDSC-Depletion | 35 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.2 | Methoden | 35 |
| 3.2.1 | Zellkulturmethoden..... | 35 |
| 3.2.1.1 | Kultivierung von Zellen..... | 35 |
| 3.2.1.2 | Ablösen adhärenter Zellen | 35 |
| 3.2.1.3 | Bestimmung der Zellzahl | 35 |
| 3.2.1.4 | Einfrieren von Zellen | 36 |
| 3.2.1.5 | Auftauen von Zellen | 36 |
| 3.2.1.6 | Gewinnung von Einzelzellsuspensionen aus Geweben/Organen der Maus | 36 |
| | a) Blut | 37 |
| | b) Milz und Lymphknoten | 37 |
| | c) Tumor | 37 |
| 3.2.2 | Murines Tumormodell | 38 |
| 3.2.2.1 | LRAST – Das Grundbehandlungsschema | 38 |
| 3.2.2.2 | MDSC - Depletion | 39 |
| 3.2.3 | Immunologische Methoden | 39 |
| 3.2.3.1 | Theorie der Durchflusszytometrie..... | 39 |
| | a) Allgemeine Methodik..... | 39 |
| | b) Grundzüge des Messvorgangs | 40 |
| | c) Prinzip der Fluoreszenz | 41 |
| | d) Wiedergabe der gemessenen Daten..... | 41 |
| 3.2.3.2 | Zellfärbung für die Durchflusszytometrie..... | 43 |
| 3.2.3.3 | Phänotypische Differenzierung verschiedener Zellpopulationen | 44 |
| 3.2.3.4 | Tod / Lebend-Bestimmung mittels Annexin-V und 7-AAD-Doppelmarkierung..... | 46 |
| 3.2.3.5 | Bestimmung der tumorspezifischen IFN- γ Freisetzung..... | 47 |
| | a) Cytokine Release Assay (CRA) | 47 |
| | b) Enzyme-linked-immunosorbent Assay (ELISA)..... | 47 |
| 3.2.4 | Statistische Methoden | 48 |
| 4. | Ergebnisse..... | 49 |
| 4.1 | Überprüfung der Vitalität rekonstituierter CD45.1 ⁺ Zellen nach dem i.v.-Transfer | 49 |
| 4.2 | Entwicklung des Rekonstitutionsproduktes in der Empfängermaus | 50 |
| 4.3 | Einfluss von LRAST auf MDSC | 51 |
| 4.4 | LRAST mit Depletion myeloider Suppressorzellen..... | 53 |
| 4.5 | Die Wirksamkeit von LRAST in D5-Melanom tragenden Mäusen | 57 |
| 4.5.1 | Tumorspezifische IFN- γ Produktion | 58 |
| 4.5.2 | Tumorwachstum nach LRAST mit oder ohne MDSC-Depletion | 59 |
| 5. | Diskussion..... | 61 |

| | | |
|-----------|-------------------------------------|-----------|
| 6. | <i>Zusammenfassung</i> | 72 |
| 7. | <i>Ausblick</i> | 73 |
| 8. | <i>Referenzen</i> | 74 |
| 9. | <i>Anhänge</i> | 84 |
| 9.1 | Abbildungsverzeichnis | 84 |
| 9.2 | Tabellenverzeichnis | 84 |
| 9.3 | Abkürzungsverzeichnis | 85 |
| 9.4 | Danksagung | 89 |
| 9.5 | Eidesstattliche Versicherung | 90 |
| 9.6 | Lebenslauf | 91 |

1. Einleitung

Das maligne Melanom stellt eine aggressive Neoplasie der pigmentbildenden Zellen der Haut dar und ist für ca. 1 % aller Krebstodesfälle verantwortlich. [1, 2] An erster Stelle der Therapieoptionen, insbesondere der lokoregionären Erkrankung, steht die chirurgische Resektion. In lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Stadien kommt die systemische Therapie mit Chemotherapeutika zur Anwendung. Die Strahlentherapie hat eine eher untergeordnete Bedeutung im Rahmen der Behandlung des malignen Melanoms. [3] Die Prognose richtet sich nach dem Tumorstadium bei Diagnosestellung. [1] Während frühe Stadien (0/I nach der *American Joint Committee on Cancer*, AJCC) eine relativ gute Prognose mit einem 5-Jahres-Überleben von über 90 % aufweisen, ist die Prognose bei Vorliegen von Metastasen trotz neuer Therapieansätze meist infaust, mit einem medianen Überleben von nur einem Jahr. [1, 4]

In den letzten Jahren hat die Immuntherapie, insbesondere durch die Entwicklung der sogenannten Checkpoint-Inhibitoren, für die Behandlung von Patienten mit malignem Melanom und anderen malignen Erkrankungen zunehmend an Bedeutung gewonnen. [5, 6] Obwohl sich das maligne Melanom gerade wegen seiner Immunogenität für immuntherapeutische Ansätze eignet und hierfür sogar als Modelltumor angesehen wird, limitiert ein immunsuppressives Tumormikromilieu den Erfolg dieser Therapien. [5, 7] Eine zentrale Rolle im Rahmen der Immunsuppression und der Toleranzentwicklung gegenüber Tumorantigenen, nehmen myeloide Suppressorzellen (*Myeloid-derived suppressor cells*, MDSC) ein. Sie sind insbesondere im metastasierten Tumorstadium in erhöhter Frequenz im peripheren Blut von Patienten nachzuweisen. [7-9] Immunologische Therapiestrategien zur Behandlung des malignen Melanoms basieren vor allem auf der Aktivierung tumorspezifischer zytotoxischer T-Zellen, beispielsweise durch die Hemmung inhibitorischer Rezeptoren, wie dem *Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein - 4* (CTLA-4) oder dem *Programmed Death Receptor - 1* (PD-1), die als Checkpoints bezeichnet werden. [5] Im Jahr 2011 wurde mit Ipilimumab der erste Checkpoint – Inhibitor zur Therapie des malignen Melanoms zugelassen, welcher dazu beitragen soll die tumorvermittelte Toleranz gegenüber tumorspezifischen T-Zellen zu durchbrechen. [10] Auch der adoptive Transfer von tumorinfiltrierenden Leukozyten stellt einen wichtigen Therapieansatz dar. [5, 7, 11]

Die Vakzinierung von Patienten mit fortgeschrittenem malignen Melanom wurde bereits eingehend in Studien untersucht, doch blieb der erhoffte Erfolg insgesamt hinter den Erwartungen zurück. [5, 6] Es ist davon auszugehen, dass die Vakzinierung als Therapiekonzept erst durch Kombination mit anderen immuntherapeutischen Ansätzen ihr

volles Potenzial entfalten wird, und dadurch eine Umkehr der Immuntoleranz gegenüber malignen Tumoren ermöglicht wird. [12] Das Immunsystem bietet dafür vielfältige Ansatzpunkte die im Folgenden erörtert werden. Das Immuntherapiekonzept, welches in dieser Arbeit verwendet wurde, stellt ebenfalls eine immunologische Kombinationsbehandlung dar, die eine Ganzzellvakzinierung mit autologen Tumorzellen in ein erweitertes Therapieschema einbettet.

1.1 Die Elemente des Immunsystems

Das Immunsystem stellt ein komplexes Gebilde aus Organen, Zellen und Molekülen dar, die den Organismus vor schädlichen Einflüssen schützen. [13] Grundlegend hierfür ist die Erkennung fremder Oberflächenstrukturen der zellulären und nicht-zellulären Pathogene und die Unterscheidung dieser vom eigenen Selbst. Im Verlauf einer Immunreaktion treten sowohl zelluläre, wie auch von Plasmaproteinen vermittelte, sogenannte humorale Abwehrmechanismen in Aktion. Es wird dabei ein angeborenes unspezifisches Immunsystem, das phylogenetisch älter ist, von einem erworbenen, oder spezifischen Immunsystem unterschieden. [14-16]

Das angeborene Immunsystem zeichnet sich durch gleichförmig wiederkehrende Aktionsmuster bei gleicher Stimulation aus. [17] Es beteiligt sich an der Erkennung eines breiten Spektrums an Pathogenen, der Präsentation fremder Antigene und Aktivierung des spezifischen Immunsystems und übernimmt die Funktion einer ersten Barriere gegenüber dem Krankheitserreger. [15, 16] Die Abwehrreaktion erfolgt rasch, jedoch wird im Gegensatz zum erworbenen Immunsystem kein Gedächtnis aufgebaut, sodass man von einem nicht-adaptiven System spricht. [15] Zu den zellulären Bestandteilen des unspezifischen Immunsystems gehören Phagozyten, wie neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen, sowie Dendritische Zellen, natürliche Killerzellen und Zellen die Entzündungsmediatoren freisetzen. Zu letzteren zählen Mastzellen, eosinophile und basophile Granulozyten. [18, 19] Ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems sind auch lösliche Faktoren im Blutplasma, zu denen das Komplementsystem, die Akute-Phase-Proteine und die Zytokine gerechnet werden. Diese Faktoren erfüllen eine Reihe wichtiger Funktionen, u.a. als Botenstoffe, Reparaturmechanismen, direkte Angriffskomplexe und Opsonine. [18]

Das adaptive, also lernfähige Immunsystem ist in der Lage ein Gedächtnis gegenüber Pathogenen aufzubauen, sodass diese bei erneuter Exposition schnell wiedererkannt und eliminiert werden können. [14] Für eine spezifische und gerichtete Reaktion dieser Art ist eine Ausstattung mit entsprechend spezifischen Rezeptoren notwendig, wie es bei T- und B-Zellen der Fall ist. B-Zellen tragen durch Bildung membrangebundener und freier Antikörper zur

Opsonierung und Elimination pathogener Mikroorganismen, der Neutralisierung von Toxinen, einer Komplementaktivierung und der antigenabhängigen Funktion zytotoxischer Zellen bei. [17] Die T-Zell Funktion schließt die Unterstützung der B-Zellen bei der Antikörperbildung, sowie die Bekämpfung intrazellulärer Pathogene durch die Aktivierung von Makrophagen oder die Elimination z.B. viral infizierter Zellen durch T-Zell vermittelte Lyse ein. [18] Andererseits spielen B-Zellen auch eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen (CD, *Cluster of Differentiation*). [20]

1.2 Die Geschichte der Tumorummunologie

Bereits im Jahr 1893 entdeckte der amerikanische Chirurg William Coley, dass es bei einem Sarkompatienten, der im Verlauf seiner Tumorerkrankung ein Erysipel entwickelt hatte, zu einem Rückgang des Tumorleidens kam. Er behandelte daraufhin bis 1936 über 800 Patienten mit einem Gemisch aus Streptokokken- und Serratia-Toxinen. Anscheinend wurde durch die bakteriellen Zellwandbestandteile eine systemische Entzündungsreaktion ausgelöst und im Rahmen dessen bestimmte Mediatoren freigesetzt, die zum Rückgang der malignen Erkrankung führen konnten. [21-23] Etwa die Hälfte der Patienten mit Weichgewebssarkomen wies ein gutes Ansprechen auf die Therapie auf. [22, 24] Zu Beginn des 20. Jahrhunderts vermutete auch Paul Ehrlich, dass das Immunsystem bei langlebigen Organismen eine wichtige Rolle bei der Prävention maligner Tumore spielen könnte. [25] Etwa fünf Jahrzehnte später formulierten Burnet und Thomas auf der Grundlage neuer Erkenntnisse über Tumorantigene und die Immunogenität maligner Zellen ihre wegweisenden Hypothesen zur Immunüberwachung (*Immunosurveillance*) von Tumoren. [25-28] Da das Immunsystem letztlich nicht nur die Tumormasse beeinflusst und zur Tumoreradikation beitragen kann, sondern die Beschaffenheit der Zellen an sich und damit ihre Immunogenität wesentlich beeinflusst, entwickelte sich um die Jahrtausendwende die Hypothese der *Immunosurveillance* weiter zur Hypothese des *Immunoediting*. [25]

1.3 Die drei Phasen des Immunoediting

1.3.1 Eliminierung

Die erste Phase des *Immunoediting* verkörpert das ursprüngliche Konzept der Immunüberwachung und Tumoreradikation (Abb. 1). [25] Im Zuge des Tumorwachstums kommt es zur Freisetzung unterschiedlicher Moleküle und Botenstoffe, welche Immunzellen um und in den entstehenden Tumor locken. Diese werden von absterbenden Tumorzellen selbst (z.B. HMGB1, *High Mobility Group Box 1*) oder durch Auflösung der Gewebeintegrität bei invasivem Tumorwachstum oder überschießender Angiogenese freigesetzt (z.B. Hyaluronan-

Fragmente) und als *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMPs) bezeichnet. [25, 29] Auch von Tumoren überexprimierte und stress-induzierte Selbstantigene wie RAE1 und H60 bei der Maus und MICA/B beim Menschen, die als Liganden des aktivierenden Rezeptors NKG2D fungieren, sowie *Major Histocompatibility Complex - I* (MHC-I) - präsentierte Tumorantigene, werden von CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen erkannt. [25, 30-32] Nicht zuletzt rekrutieren und aktivieren sogenannte Gefahrensignale, zu denen Typ I Interferone gehören, Zellen des angeborenen Immunsystems. [25]

Auf diese Weise sind an der initialen Immunantwort gegen den Tumor insbesondere NKT-, NK- und γ/δ -T-Zellen, sowie Makrophagen und Dendritische Zellen beteiligt, von denen die ersten drei durch ihr Produktion von Interferon- γ (IFN- γ) einen wichtigen Anstoß zur Ausweitung der anti-Tumor Immunität und Involvierung des adaptiven Armes geben. [33] IFN- γ vermittelt dabei angiostatische und antiproliferative Effekte [33-35], und beeinflusst die Immunogenität der Tumorzellen positiv, indem es zur verbesserten Präsentation von Tumorantigenen auf MHC-Klasse I Molekülen beiträgt. [36] IFN- γ stimuliert zusätzlich die Produktion von Chemokinen (z.B. C-X-C-Motiv Chemokin - Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11), die selbst angiostatische Effekte haben. Diese und andere Chemokine locken weitere Immunzellen an, sodass der Tumor an verschiedenen Fronten bekämpft wird: zytotoxische T-Zellen interagieren mit FAS- und TRAIL-Rezeptoren und sezernieren Perforine und Granzyme, γ/δ -T-Zellen bekämpfen Tumorzellen die NKG2D-Liganden exprimieren, Makrophagen und NK-Zellen aktivieren sich reziprok durch IFN- γ und IL-12 (Interleukin-12) und wirken zusammen mit Granulozyten durch Mediatoren wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), IL-1, IL-12, Perforine und reaktive Sauerstoffspezies (ROS). [31, 33]

Dendritische Zellen phagozytieren abgestorbene Tumorzellen und erfüllen ihre Funktion als antigenpräsentierende Zellen in den Lymphknoten, die das Tumorgebiet drainieren. Dort wird die Produktion tumorspezifischer CD4⁺ T-Helferzellen und in der Folge die Bildung tumorlytischer CD8⁺ T-Zellen induziert. Die tumorspezifischen CD4- und CD8- T-Zellen infiltrieren den Tumor und können weitere Tumorzellen zerstören. [25, 33]

Im Idealfall endet der Prozess des *Immunoediting* mit der Eliminierungsphase und der kompletten Zerstörung des Tumors. Überleben bestimmte Tumorzellklone, so schließen sich die im Folgenden beschriebenen Phasen, *Equilibrium* und *Escape*, des *Immunoediting* an (Abb. 1). [33]

1.3.2 Equilibrium

Tumorzellen, welche die Eliminationsphase überstanden haben, befinden sich in der Phase des *Equilibrium*s in einem Gleichgewicht aus Lyse bestimmter Tumorzellvarianten und der

Entstehung neuer Tumorzellklone (Abb. 1). Die Erkrankung persistiert zwar, wird jedoch durch das Immunsystem in einem Ruhezustand gehalten und bricht nicht aus. Durch Selektion entstehen immer wieder neue Mutationen und Mechanismen, die es den Tumorzellen ermöglichen der Immunantwort zu entgehen. Möglicherweise nimmt diese Phase den größten zeitlichen Rahmen im Tumorbildungsprozess in Anspruch und kann sich über viele Jahre erstrecken. Der adaptive Arm des Immunsystems, insbesondere CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen, sowie die Zytokine IFN- γ und IL-12, spielen dabei eine zentrale Rolle. Dem angeborenen Immunsystem kommt in dieser Phase eher eine untergeordnete Bedeutung zu. [33, 37]

1.3.3 Escape

Die letzte Phase des *Immunoediting* (*Escape*) beschreibt das Ausbrechen der malignen Erkrankung aus dem Gleichgewicht, in dem das Immunsystem das Tumorstadium noch eindämmen konnte (Abb. 1). Gravierende genetische und epigenetische Veränderungen ermöglichen es den Tumorzellen, sich nun uneingeschränkt zu vermehren. Neben vielen weiteren Veränderungen tragen ein ausgeprägtes immunsuppressives Milieu, sowie der Verlust von Tumorantigenen und MHC-Klasse-I Molekülen dazu bei, dass das Immunsystem unterlaufen wird. [31, 33] Die Erkrankung wird klinisch manifest und führt unbehandelt zum Tod des Individuums. [33]

1.4 Tumorstroma und tumorinfiltrierende Leukozyten

Tumorzellen sind eingebettet in eine Umgebung, die aus diversen zellulären und nicht zellulären Bestandteilen wie Fibroblasten, Myofibroblasten, neuroendokrine Zellen, Adipozyten, Zellen und Komponenten des Lymph- und Gefäßsystems, Immunzellen lymphoiden und myeloiden Ursprungs und nicht zuletzt der extrazellulären Matrix besteht. [38, 39] Dieses Tumormikromilieu steht in regem Austausch mit den Tumorzellen und beeinflusst das Tumorstadium, sowie die Tumorstadium und Metastasierungs. [39, 40] Hanahan und Weinberg [41] definierten acht maßgebliche Eigenschaften maligner Tumorerkrankungen, von denen sieben durch das Tumorstroma mitbeeinflusst werden: Aufrechterhaltung von Proliferationssignalen, Aufhebung einer Wachstumssuppression, Vermeidung des Zelltods, Induktion der Angiogenese, Invasion und Metastasierungs, Umgehung der Immunüberwachung und –zerstörung und Umprogrammierung des Zellstoffwechsels. [42]

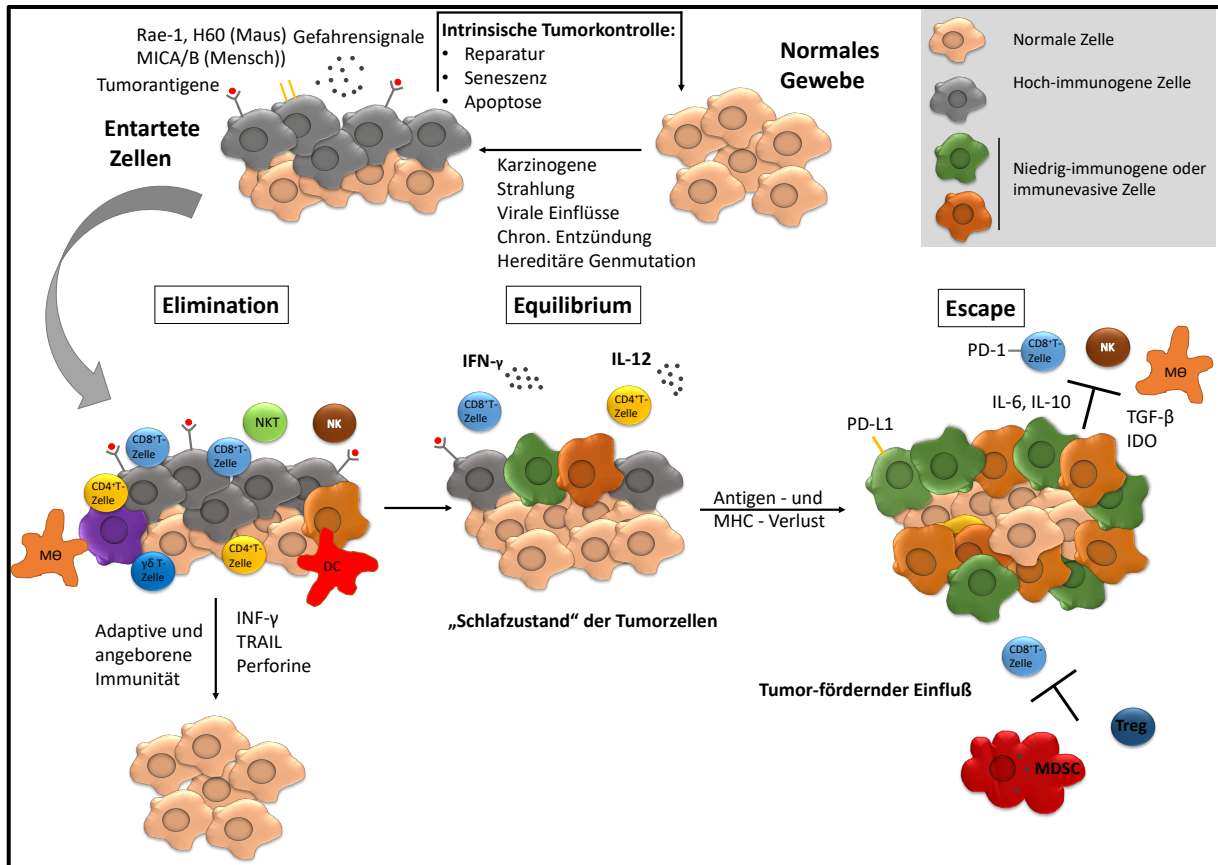


Abb. 1: Immunoeediting. Adaptiert aus [25]. Das Konzept des Immunoeediting beschreibt ein extrinsisches System und damit die Abläufe und Interaktionen des Immunsystems mit dem Tumor, wenn die intrinsische Tumorregulation versagt hat. In seinem vollen Umfang gliedert es sich in drei Phasen: Elimination, Equilibrium und Escape. Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems beteiligen sich an der anti-Tumor Antwort und erkennen entartete Zellen dabei auf vielfältige Art und Weisen, z.B. durch Gefahrensignale (hierzu zählen u.a. Typ I Interferone) oder Tumorantigene, die auf MHC-I-Molekülen präsentiert werden. Kann der Tumor ganz beseitigt werden endet mit der Eliminationsphase der Prozess des *Immunoeediting*. In der Phase des Equilibriums persistiert der Tumor, wird jedoch vom Immunsystem im Zaum gehalten. Durch Selektionsprozesse wird die Immunogenität des Tumors in dieser Phase geformt. Entstehen im Rahmen der Selektion Tumorzellvarianten, die weniger immunogen sind (Antigen -/MHC - Verlust) oder gelernt haben den Effektormechanismen des Immunsystems standzuhalten, schließt sich die Phase des *Escape* an. Ein immunsuppressives Milieu im und um den Tumor wird durch vermehrte Expression bestimmter Moleküle (z.B. PD-L1 (Programmed death receptor ligand 1), IDO (Indolamin-2,3-Dioxygenase), TGF-β (Transforming growth factor β), IL-6, IL-10) und durch Rekrutierung bestimmter Zelltypen (MDSC, Treg) aufrechterhalten und trägt zum Immun-*Escape* bei.

Im physiologischen Zustand bietet das Stroma, noch bevor es zum Tumorstroma wird, eine Schutzfunktion gegen die Entstehung eines Tumors. [38, 40] Am Beispiel des duktales Adenokarzinoms der Pankreas konnte am Tiermodell gezeigt werden, dass Fibroblasten unter anderem durch Unterdrückung der Angiogenese dem Tumorwachstum entgegenwirken können. [43] Daneben erfüllen bestimmte Leukozytenpopulationen des adaptiven und angeborenen Immunsystems als tumorinfiltrierende Leukozyten (TILs) eine wesentliche Rolle im Dienste der Tumorabwehr. [44] Dazu zählen T-Lymphozyten, NK-Zellen, N1 neutrophile Granulozyten und M1 Makrophagen, die über zellkontaktabhängige Mechanismen und auch

lösliche Mediatoren (Chemokine und Zytokine) in Aktion treten. [44, 45] Insbesondere die Infiltration mit CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen und Th1 Lymphozyten korreliert nachweislich positiv mit dem Patientenüberleben. [46, 47]

Dennoch bauen Tumorzellen durch vielschichtige Mechanismen und unter Einbeziehung des Tumormikromilieus eine immunsuppressive Umgebung auf. [48] Wesentlicher Bestandteil hiervon sind myeloide Suppressorzellen. MDSC können auf vielfältige Art und Weise den *Immunescape* bei Vorliegen einer malignen Erkrankung unterstützen. Abbildung 2 gibt eine Übersicht über die zahlreichen zellulären und nicht-zellulären Komponenten, die das Zusammenspiel aus MDSC, dem Tumor und tumorreaktiven Immunzellen, insbesondere zytotoxischen T-Zellen, prägen. Die herausragende Rolle der MDSC für das Tumorgeschehen, ihre Herkunft und besonderen Eigenschaften sind auf den folgenden Seiten aufgeführt.

1.4.1 MDSC

Myeloid-Derived Suppressor Cells oder MDSC sind unreife Zellen aus dem Knochenmark und verharren in verschiedenen Stufen der Myelopoese. [49] Sie haben eine herausragende Rolle bei der Regulation der Tumorummunologie und weiterer pathologischer Prozesse. Besondere Merkmale sind ihre Heterogenität und biologische Komplexität. [50] Sie greifen an unterschiedlichen Stellen in die gegen einen Tumor gerichtete Immunantwort ein und hemmen vor allem die Bildung tumorspezifischer T-Zellen, sowie die Effektorfunktion zytotoxischer T-Zellen. [50-52]

1.4.1.1 Ursprung und Begriffsklärung

Die ersten Hinweise auf eine immunsuppressive Population aus dem Knochenmark stammender Zellen im Rahmen maligner Erkrankung tauchten vor über 25 Jahren auf. [53] Bei den MDSC handelt es sich nicht um eine einzelne Zellpopulation, sondern um eine heterogene Gruppe von myeloiden Vorläufern, die in verschiedenen pathologischen Situationen wie Infektion und Sepsis, Trauma, akuten sowie chronischen Entzündungszuständen und nach Organtransplantation expandieren. [53, 54] Durch die Unterdrückung autoreaktiver T-Zellen sind sie an der Schaffung und Aufrechterhaltung einer peripheren Toleranz beteiligt und verhindern auf diese Weise Gewebeschäden. [55, 56] Myeloide Vorläuferzellen gleichen Phänotyps scheinen im physiologischen Rahmen keine suppressiven Eigenschaften aufzuweisen und differenzieren in der Peripherie regelrecht zu Makrophagen, Granulozyten und dendritischen Zellen aus. [50, 57] Bei gesunden Mäusen finden sie sich überwiegend im Knochenmark (20-30 % der myeloiden Zellen), wohingegen sie im Blut und in der Milz weniger als 4 % und in den Lymphknoten weniger als 1 % entsprechen. [58] Bei Mäusen mit etablierten Tumoren dagegen steigt der Anteil an MDSC in der Milz auf bis zu 40 % (aller

kernhaltigen Zellen). MDSC sind dann auch im Tumor und in den Lymphknoten der Tiere nachweisbar. [53, 56] Wurden immunsuppressive MDSC aus Mäusen mit etablierten Tumoren isoliert und in tumorfreiem Milieu kultiviert, konnten sie nach Transplantation in gesunde Empfänger zu funktionell kompetenten Makrophagen oder dendritischen Zellen ausreifen. [50, 59-61]

1.4.1.2 Phänotypische Charakterisierung der MDSC-Subtypen

Da MDSC keinen einheitlichen Zelltyp darstellen, ist eine eindeutige phänotypische Charakterisierung nicht möglich. Sie repräsentieren aktivierte, unreife monozytäre und granulozytäre Zellen mit unterschiedlichen Eigenschaften und Funktionen. [62] In Mäusen exprimieren alle MDSC die Oberflächenmoleküle CD11b (α_M -Integrin) und Gr-1 (charakteristisches Antigen der myeloiden Differenzierungsrichtung). Da anti-Gr-1 Antikörper an ein gemeinsames Epitop von Ly6G und Ly6C binden und somit keine Unterscheidung diesbezüglich zulassen, lässt sich eine genauere Differenzierung der MDSC mit separaten anti-Ly6C und anti-Ly6G Antikörpern erreichen. Monozytäre MDSC (M-MDSC) tragen die Marker der Monozyten-Makrophagen-Linie F4/80 und CD115. Genauer lassen sie sich am ehesten als inflammatorische Monozyten einordnen ($\text{Ly6C}^{\text{high}}$ CCR2^+ $\text{CX3CR1}^{-/\text{low}}$ CD62L^+). [63] Vereinfacht und im Folgenden verwendet ist die Betrachtung der M-MDSC als CD45^+ CD11b^+ $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ Ly6G^- - Zellen. MDSC mit segmentkerniger Morphologie werden in der Literatur teils als polymorphonukleäre MDSC (PMN-MDSC) [63], teils als granulozytäre MDSC (G-MDSC) [64] bezeichnet, da sie phänotypisch am ehesten neutrophilen Granulozyten entsprechen. Sie tragen charakteristischerweise Ly6G auf ihrer Oberfläche und sind bei durchflusszytometrischer Messung in Hinsicht auf das Seitwärtsstreulicht in einem hohen Bereich anzusiedeln. Im Folgenden wird der Begriff PMN-MDSC verwendet und die Zellen als CD45^+ CD11b^+ $\text{Ly6C}^{+/\text{mid}}$ Ly6G^+ - Zellen definiert. [53, 63] PMN- und M-MDSC weisen eine niedrige bis fehlende Expression von MHC-Molekülen der Klasse 2 auf. [63, 65, 66]

1.4.1.3 Expansion, Aktivierung und Suppressivität der MDSC

Myeloide Zellen zeichnen sich durch eine ausgesprochene Plastizität aus. Das umgebende Milieu und die löslichen Mediatoren darin entscheiden, ob eine Knochenmarkszelle ausreift und immununterstützend wirkt, oder in einem unreifen Zustand verbleibt und immunsuppressive Eigenschaften aquiriert. [56] Th2-Zytokine, wie IL-4 und IL-10, verstärken die suppressiven Eigenschaften myeloider Suppressorzellen. Th1-Zytokine dagegen fördern die Ausreifung dieser Zellen und vermitteln einen positiven Einfluss auf antigenspezifische zytotoxische T-Zellen. [56, 59, 60] Auch vitale und apoptotische Tumorzellen, sowie Zellen des Tumorstromas sezernieren MDSC-aktivierende und -expandierende Faktoren. [53]

Abb. 2: Interaktion zwischen Tumorzellen, Tumorstroma und MDSC. In der unmittelbaren Tumorumgebung finden sich zelluläre und nicht-zelluläre Bestandteile, die in ihrer Gesamtheit das Tumorstroma darstellen. Zudem üben tumorinfiltrierende Leukozyten tumorfördernde und – hemmende Effekte aus. Die Abbildung fasst zahlreiche Mechanismen zusammen, mit denen MDSC das Tumorwachstum direkt (z.B. MMP9, VEGF, IL-6, NO) und indirekt, über die Hemmung der Funktion von Effektor-T-Zellen (z.B. Deprivation der Aminosäuren L-Arginin, L-Cystein und L-Tryptophan; ROS; Herabregulation von CD62L; PD-L1-Expression) und die Hemmung tumorinhibierender Leukozytenpopulationen (z.B. NK-Zellen), wie auch Rekrutierung und Aktivierung weiterer immunsuppressiver Zellen (Th17-Zellen, Treg, M2-Makrophagen), unterstützen. Fernab vom Tumormikromilieu hemmen MDSC auch in peripheren lymphatischen Organen die Induktion tumorreaktiver T-Zellen. Tumorzellen selbst und das umgebende Tumorstroma sezernieren Faktoren, welche die Bildung der MDSC im Knochenmark (bei Mäusen auch in der Milz) anregen und zu einer Anreicherung in der Peripherie und im Tumor führen (z.B. GM-CSF, VEGF, TGF- β , IL-6). Chemokine (C-C-Motiv Chemokin-Liganden: CCL2, CCL5; C-X-C-Motiv Chemokin-Liganden: CXCL-1 /-5 /-6 /-8 /-12) und Entzündungsmediatoren (z.B. S100A8/A9) locken MDSC in das Tumorbett. Einige der involvierten Moleküle führen neben dem Beitrag zur Expansion und Rekrutierung der MDSC, auch zu ihrer Aktivierung, bzw. Stimulation und Verstärkung immunsuppressiver Eigenschaften (u.a. IFN- γ , IL-1 β , TNF- α , PGE2). Zahlreiche regulatorische Proteine (darunter COX-2, HMGB1, S100A8/A9) und Transkriptionsfaktoren (STAT1/3/5/6, NF- κ B, HIF-1 α , NOTCH) sind in die beschriebenen Prozesse involviert.

Abkürzungen: Akt, Proteinkinase B; Arg-1, Arginase-1; ADAM, A Disintegrin And Metalloproteinase; Bcl-xL, B-cell lymphoma-extra large; bFGF, basic fibroblast growth factor; COX-2, Cyclooxygenase-2; C/EBP- β , CCAAT/enhancer binding protein- β ; Erk, extracellular signal-regulated kinases; FOXP3, Forkhead-Box-Protein P3; G-CSF, granulocyte-colony stimulating factor; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; HIF-1 α , hypoxia-inducible factor-1 α ; H₂O, Wasser; H₂O₂, Wasserstoffperoxid; L-Arg, L-Arginin; JAK, Janus Kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; M-CSF, macrophage colony-stimulating factor; MMP, Matrix-Metalloproteinase; MYC, von Myelocytomatose (ein Onkoprotein mit weitreichenden Einflüssen auf Proliferation, Apoptose, Metabolismus und Differenzierung von Zellen) [67]; MyD88, myeloid differentiation primary response gene 88; NF- κ B, Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells; NO, Stickstoffmonoxid; NOTCH, ein Signalweg mit gleichnamigem Rezeptor; NOX-2, NADPH-Oxidase-2; NRF-2, Nuclear factor erythroid 2-related factor; PGE2, Prostaglandin E2; PD, programmed death receptor; SCF, stem cell factor; STAT, signal transducer and activator of transcription; TCR, T cell receptor; TCR ζ , TCR zeta chain; TLR, Toll-like receptor; VEGF, vascular endothelial growth factor. [49, 68-89]

a) Expansion und Aktivierung von MDSC

Faktoren, wie GM-CSF, M-CSF, COX-2, PGE2, SCF, IL-1 β , IL-6, TGF- β , TNF α und VEGF fördern die Bildung und Expansion myeloider Suppressorzellen. [49, 90] Die Wachstumsfaktoren oder Zytokine binden an ihre Rezeptoren und aktivieren dadurch insbesondere Tyrosinkinasen aus der Proteinfamilie der Janus-Kinasen (JAK), die wiederum Transkriptionsfaktor der STAT-Gruppe (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) phosphorylieren. [68] Im Rahmen der Proliferation der MDSC ist vor allem STAT3 bedeutsam, welches zur vermehrten Expression der Proteine Survivin, MYC, Cyclin D1 und Bcl-xL führt. Diese wirken anti-apoptotisch, fördern die Zellproliferation und bewirken einen Arrest der Differenzierung myeloider Zellen. [53, 68] STAT3 bewirkt auch eine erhöhte Expressionsrate der beiden Moleküle A8 und A9, die zur Familie der S100-Kalzium-bindenden Proteine gehören und eine wichtige Rolle im Rahmen von Entzündungsreaktionen spielen. [68, 91, 92] S100A8 und S100A9 sind außerdem chemotaktisch wirksam und leiten MDSC zur Stelle des

Tumors, tragen aber auch durch Bindung an RAGE zu den immunsuppressiven Eigenschaften der MDSC bei. [49] Indem S100A9 an CD33 auf MDSC bindet induziert es außerdem die Produktion von IL-10, TGF- β und Arg-1 und begünstigt die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. [68] Auch TNF- α , das durch Wirkung von IL-1 β vermehrt durch Tumorzellen und MDSC produziert wird, wirkt sich auf vermehrte Spiegel von S100A8/A9 aus. [49, 90]

Aktivierte T-Zellen und Tumor-Stromazellen produzieren IFN- γ , IL-4 und IL-13, Liganden der Toll-like-Rezeptoren und TGF- β , wodurch in myeloiden Zellen Signalkaskaden aktiviert werden, welche die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT6, ebenso wie NF- κ B miteinschließen. [53, 57] Hierdurch erhalten MDSC einen Proliferationsanreiz und es werden immunsuppressive Mechanismen, unter anderem durch vermehrte Aktivierung von Arg-1, iNOS und der Bildung von TGF- β , verstärkt. [53, 68] Nicht nur Tumore, sondern auch bakterielle und virale Faktoren können durch Bindung an Toll-like Rezeptoren (TLR) und vermittelt durch MyD88 und NF- κ B zu einer Aktivierung von MDSC beitragen. [53, 57] Liganden des TLR2 führen über eine gesteigerte autokrine IL-6-Produktion zu einer STAT3-Aktivierung. [81, 93, 94] Auch TLR4 steigert über die Induktion von NF- κ B und STAT3 die Immunsuppressivität der MDSC und führt zu ihrer Expansion und Aktivierung. [93, 95]

T-Helfer 17 (Th17) Zellen werden durch ihre IL-17 Produktion definiert und treten üblicherweise bei der Abwehr extrazellulärer Bakterien, Viren und Pilze in Aktion. [96] Ihre Rolle im Rahmen von Krebserkrankungen scheint noch nicht eindeutig geklärt zu sein. Tumorfördernde (z.B. Verstärkung der Tumorangiogenese), wie auch tumorinhibierende (z.B. Verstärkung von tumorgerichteten NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen) Effekte wurden beobachtet. [97, 98] Bezogen auf MDSC ist die Wirkung von IL-17 mit einer vermehrten Expression von Arg-1, COX-2 und der Indolamin 2,3 – dioxygenase (IDO) assoziiert. IDO ist wesentlicher Bestandteil des Tryptophanstoffwechsels und führt zum Katabolismus dieser Aminosäure, wodurch regulatorische T-Zellen (Treg) induziert und zytotoxische T-Zellen inhibiert werden. [49, 69, 71, 72, 85] IL17 produzierende Zellen können dabei durch das Chemokin CCL4 durch MDSC angelockt werden. [99]

Unter Hypoxiebedingungen um den Tumor und induziert durch das Chemokin CCL5 kommt es zur vermehrten Produktion des *Hypoxia-Inducible Factor-1 α* (HIF1- α) [100], der zur vermehrten Bildung von VEGF führt. HIF1- α trägt zudem zur Phosphorylierung und Aktivierung von STAT3 und zur vermehrten Expression von PD-L1 bei. [49, 90, 92] Daneben führt auch IFN- γ zur Heraufregulation von PD-L1 und zudem zur verstärkten NO-Produktion durch MDSC. [90]

Neben STAT1, STAT3 und STAT6 ist auch der Transkriptionsfaktor STAT5 in die Regulation der MDSC involviert. Seine Aktivierung führt zur Hemmung des *Interferon Regulatory Factor 8* (IRF-8), was zur Reifungshemmung myeloider Zellen führt und dadurch zur Expansion der MDSC beiträgt. [68]

b) Suppressive Funktion der MDSC

MDSC sind eingebettet in ein komplexes Netzwerk aus Akteuren des angeborenen und erworbenen Immunsystems und beteiligen sich auf vielfältige Art und Weise an der Balance zwischen positiver und negativer Regulation der Immunantwort bei Tumorwachstum. [51, 101] MDSC induzieren die Tumorangiogenese [76], unterdrücken die tumorlytische Funktion von NK-Zellen, verstärken die Differenzierung zu alternativ aktivierten Makrophagen (Typ 2 Makrophagen) und vermindern die Anzahl reifer dendritischer Zellen (DC). [51] Einige Faktoren beeinflussen T-Zellen und hemmen ihre Wirkung gegen den Tumor. [69, 80]

Die wichtigsten Wirkmechanismen, durch die MDSC T-Zellen inhibieren, sind die Enzymaktivität der Arg-1 und der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS = NOS2), sowie die Heraufregulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), zu denen Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Peroxinitrit ($ONOO^-$) und Superoxid-Anionen (O_2^-) gehören. [50, 57, 68, 80] Neben L-Arginin, das als Substrat für die beiden oben genannten Enzyme dient, spielt der Metabolismus der Aminosäuren Zystein und Tryptophan eine wichtige Rolle bei der T-Zell-Suppression. [51, 77, 102-104] Die Dysfunktion der T-Zellen äußert sich durch die Verminderung der antigenabhängigen Zytokinsekretion [50, 66], durch direkte Apoptoseinduktion [105, 106] und durch Herabregulation von L-Selektin (CD62L) in $CD4^+$ und $CD8^+$ Lymphozyten. L-Selektin ist unter anderem für die Extravasation der T-Zellen und das Erreichen des lymphatischen Gewebes und des Tumorgewebes verantwortlich. [79] Auch die Induktion von Treg [73, 107, 108], die Ausschüttung von immunmodulatorischen Faktoren wie H_2O_2 , $TNF-\alpha$ und $TGF-\beta$ [51], sowie die Hochregulation der COX-2 und von PGE2 hemmen die Funktion von Effektor-T-Zellen. [57]

Es gibt auch Hinweise auf einen direkten Einfluss von MDSC auf das Tumorwachstum. Toh *et al.* führten hierzu Untersuchungen an einem uvealen Melanommodell durch. Koinkubation zuvor isolierter PMN-MDSC mit Tumorzellen führte ohne Zellkontakt zu verstärkter Proliferation der Tumorzellen. Auch konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass PMN-MDSC bei der Epithelial-Mesenchymalen-Transition (EMT) von Tumorzellen eine Rolle spielen. [45, 109] Die EMT zählt dabei als entscheidender Faktor der Tumorzell dissemination und Metastasierung. [110] Durch Freisetzung von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), darunter MMP9, können MDSC dazu beitragen die Extrazellulärmatrix und benachbarte

Basalmembranen aufzulockern. [49, 69] Auch von MDSC freigesetztes NO und IL-6 wirken direkt auf Tumorzellen. IL-6 aktiviert STAT3 und NO hält über den NOTCH-Signalweg diese Aktivierung aufrecht. Diese und andere Faktoren führen dazu, dass Tumorzellen Stammzeleigenschaften akquirieren. [49]

Vor allem M-MDSC zeichnen sich durch eine erhöhte Expression von Arginase und iNOS aus. [53, 57] Beide Enzyme verwerten die nicht-essentielle Aminosäure L-Arginin. Die Arginase erzeugt aus L-Arginin Harnstoff und L-Ornithin. [53] Durch den vermehrten Verbrauch von L-Arginin durch die MDSC wird es den T-Zellen in ihrer Umgebung entzogen. Hierdurch werden T-Zellen in ihrer Proliferation eingeschränkt und weisen eine verminderte Zytokinproduktion auf. Diese Effekte gehen zurück auf eine verminderte Expression der CD3 ζ -Kette des T-Zellrezeptors [111] und eine verminderte Produktion der Zellzyklusregulatoren Cyclin D3 und der Cyclin-abhängige Kinase 4 (CDK4). [112] iNOS erzeugt durch den Metabolismus von L-Arginin Stickstoffmonoxyd (NO), welches u.a. in den JAK3 / STAT5-Signalweg in T-Zellen hemmend eingreift und dadurch die IL-2 Wirkung beeinflusst. [113] Zudem führt es zur verminderten MHC-II-Expression und Apoptose von T-Zellen. [53, 105]

ROS entstehen durch den NADPH-Oxydase Komplex und sind vor allem Merkmal der PMN-MDSC. [50] Die Hauptwirkung übernimmt dabei Peroxynitrit, das durch eine Reaktion zwischen NO und einem Superoxid-Anion entsteht. Es kann durch die Nitrierung des T-Zell-Rezeptors (TZR) die TZR/MHC - Interaktion und damit die Antigenerkennung von T-Zellen beeinträchtigen. [57, 114-117]

1.5 Immuntherapie gegen Krebs

Die erfolgreiche Anwendung von Coley's Toxin zeigte, dass das Immunsystem therapeutisch gegen Tumore eingesetzt werden kann. [23] Da die konventionellen Krebstherapien bestehend aus Chirurgie, Radio- und Chemotherapie oft nicht zu einer Heilung des Patienten führen, scheint das Immunsystem eine sinnvolle Ergänzung zu bisherigen Therapiestrategien, bis hin zu eigenständigen Behandlungskonzepten, zu sein. [118, 119] Durch steten Informationsgewinn auf dem Gebiet der Tumorummunologie wurden mit der Zeit unterschiedliche Therapiestrategien entwickelt und bestehende Konzepte verbessert. Auch die Kombination verschiedener immuntherapeutischer Ansätze, sowie die Kombination aus Immuntherapie und klassischen Therapieverfahren, birgt Vorteile und wurde in zahlreichen tierexperimentellen und klinischen Studien untersucht. [119, 120]

1.5.1 Aufbau einer Immunität gegen den Tumor

Das Immunsystem erkennt einen Tumor an Tumorantigenen. [121] Diese können in unterschiedliche Klassen eingeteilt werden. Man unterscheidet Antigene viralen Ursprungs, solche, die durch Mutation oder Rekombination kodierender DNA-Sequenzen entstanden sind und Keimzellantigene, die durch verschiedene Krebsentitäten exprimiert sein können, jedoch unter physiologischen Bedingungen nur auf Keimzellen und Trophoblasten zu finden sind. [22, 118, 121, 122] Ferner gibt es Differenzierungsantigene (beispielsweise Melan-A / MART-1, Tyrosinase und gp100 der Melanozyten), die zelltypspezifisch in normalem und entartetem Gewebe zu finden sind, sowie Antigene, die allein durch ihre übermäßige Expression charakterisiert werden können und durch Überschreitung eines bestimmten Expressionslevels zu einer T-Zell-Antwort führen können. Einen typischen Vertreter der zuletzt genannten Gruppe stellt der Wachstumshormonrezeptor und Tyrosinkinase HER2/neu dar. [118, 121]

Dendritische Zellen nehmen als antigenpräsentierende Zellen (APC) Tumorantigene auf und prozessieren diese. Anschließend erfolgt die Präsentation der Peptidfragmente auf der Oberfläche der APC mittels MHC Klasse I oder Klasse II Molekülen. [48] Auch Tumorzellen präsentieren ihrerseits Antigene auf MHC-Molekülen der Klasse I, seltener der Klasse II. [118] Die Antigene können absterbenden Tumorzellen entstammen, die von den DC auf natürlichem Weg aufgenommen werden, oder es erfolgt eine exogene Antigenzufuhr, z.B. in Form einer Vakzine. Die mit Antigenen beladenen DC wandern daraufhin in lymphatische Gewebe ein, wo die eigentliche Interaktion mit naiven $CD8^+$ T-Zellen stattfindet. Aufgrund ihrer zytotoxischen Eigenschaften haben $CD8^+$ T-Zellen eine besonders wichtige Funktion in der anti-Tumor Antwort. Es werden aber auch $CD4^+$ T-Zellen, B-Zellen, NK- und NKT-Zellen in den Prozess einbezogen. [48] Um eine protektive Immunantwort zu erzeugen bedarf es einer Aktivierung der DC, die unter anderem von den Tumorzellen selbst ausgehen kann (z.B. Ausschüttung von ATP durch absterbende oder nekrotische Tumorzellen) oder wiederum exogen hervorgerufen wird (z.B. durch exogene Zufuhr von TLR-Liganden). Bleiben die Reifungssignale aus, wird durch die beteiligten DC eher eine Immuntoleranz mit einem anergen T-Zell-Status und die Aktivierung regulatorischer T-Zellen hervorgerufen. [48] Auch die T-Zellen selbst können durch die Expression von kostimulatorischen Molekülen die Immunantwort in die eine, oder die andere Richtung treiben. Die Bindung von CD28 (oder OX40) auf T-Zellen an CD80/86 (oder OX40L) auf DC fördert die Bildung von T-Zellen mit einer Effektorfunktion gegen den Tumor. Ein Zusammenspiel von CTLA-4 mit CD80/86 oder PD-1 mit PD-L1 / PD-L2 (*Programmed Death Receptor Ligand 1 / 2*) hingegen führt eher zur Tumortoleranz und zur Bildung regulatorischer T-Zellen. Die aktivierten tumorantigenspezifischen T-Zellen kommen über das Blut in Kontakt mit dem Tumor und

erfüllen ihre Effektorfunktion. [48] Ein Teil der antigenerfahrenen Zellen verbleibt als Gedächtniszellen im Organismus. [123, 124] Tumore kennen allerdings diverse Abwehrmechanismen, die ein immunsuppressives Milieu in Tumornähe und im Tumor selbst generieren und so die Wirkung der Effektorzellen hemmen. [48]

1.5.2 Arten der Immuntherapie

Eine vielversprechende aktuelle Entwicklung in der Krebs-Immuntherapie ist die sogenannte Checkpoint-Blockade. Zur Verhinderung einer überschießenden Aktivität und Expansion zytotoxischer T-Zellen besteht eine Negativregulation durch CTLA-4 und PD-1. Eine Blockade dieser Rezeptoren mit monoklonalen Antikörpern (z.B. Ipilimumab = anti-CTLA-4 mAk; Pembrolizumab = anti-PD-1 mAk) führt zur Entzügelung der Wirkung von tumorreaktiven T-Zellen. [125-127] Die Checkpoint-Blockade ist jedoch ein Ansatz unter Vielen um die Immuntoleranz gegenüber Tumoren zu durchbrechen. Im Folgenden sollen die wesentlichen Therapieansätze erläutert werden.

Allgemein werden aktive und passive, sowie spezifische und unspezifische Arten der Immuntherapie unterschieden. [21, 22]

1.5.2.1 Aktive Immuntherapie

Zu den aktiven Immuntherapien zählen unter anderem die Anwendung von Vakzinen und die Zytokintherapie. Vakzinierungsstrategien haben als Ziel die Zellzahl und die Rezeptoravidität tumorspezifischer T-Zellen zu erhöhen [119] und werden in prophylaktische und therapeutische Vakzinierungen eingeteilt. [48] Die Vermeidung von Krebsleiden durch primärprophylaktische Vakzinierung gegen Entitäten viralen Ursprungs (Hepatitis B Virus, HPV) wird mittlerweile erfolgreich durchgeführt. [48, 128, 129] Die therapeutische Vakzinierung bei bereits etabliertem Tumorleiden gestaltet sich hingegen schwierig und erfordert das Durchbrechen der induzierten immunologischen Toleranz. [48] Die Vakzine kann dabei aus bestimmten Proteinen oder Polypeptiden bestehen. Am Beispiel des humanen Melanoms gehören dazu unter anderem gp100, Tyrosinase, TRP-1 und Melan-A/MART-1. [22] Ganzzellvakzine, einschließlich lysierter Tumorzellen [130] und bestrahlter autologer oder allogener Tumorzellen [21] liefern eine polyvalente Stimulation und zeichnen sich durch eine geringe Toxizität gegenüber anderen Geweben aus. [22] Ferner werden Vakzineformen unterschieden, die sich viraler Vektoren, genetisch modifizierter autologer Tumorzellen und der Fusion von Tumorzellen mit APCs bedienen, oder aus DNA (Desoxyribonukleinsäure) -Plasmiden bestehen. [119] Auch allogene Tumorzellen lassen sich durch Transfektion mit Zytokin-Genen als Adjuvanz modifizieren und führen zur Immunisierung gegen Tumorart-spezifische Antigene. [21]

Zytokine entfalten ihre Wirkung physiologischerweise über autokrine und parakrine Mechanismen durch Bindung an einen spezifischen Rezeptor. [131] Bislang sind IFN α und IL-2 als Einzelsubstanzen zur Therapie für bestimmte Indikationen, darunter Nierenzellkarzinome, Melanome, Leukämien, Lymphome und Kaposi-Sarkome, zugelassen. [132-135] Eine wichtige Rolle erfüllen Zytokine wie IL-2, IL-12 und GM-CSF auch als Adjuvantien, um die Immunantwort gegen das verabreichte Antigen zu verbessern. [131, 136-140] Das Bacillus Calmette-Guerin (BCG) und das *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) sind zwei weitere Beispiele der zahlreichen Adjuvantien. [22]

1.5.2.2 Passive Immuntherapie

Zu den passiven Immuntherapien zählt beispielsweise die Anwendung von monoklonalen Antikörpern. Diese können mit einem Chemotherapeutikum oder einer radioaktiven Substanz konjugiert, oder unkonjugiert gegen diverse Zielantigene gerichtet, verwendet werden (Rituximab: anti-CD20 mAk; Cetuximab, Panitumumab, Nimotuzumab: anti-EGFR mAk; Bevacizumab: anti-VEGF mAk¹). [118, 141] Zu den passiven Ansätzen zählen auch Therapieformen, die mit einem adoptiven Zelltransfer einhergehen. Hierzu gehören Lymphokin-aktivierte Killerzellen (LAK) [142], Zytokin-induzierte Killerzellen (CIK) [143] und die Anwendung von tumorinfiltrierenden Leukozyten (TIL), welche patienteneigene Zellen darstellen, die erst ex vivo expandiert und dann adoptiv transferiert werden. Insbesondere mit dem adoptiven Transfer von TILs sind sehr gute therapeutische Ergebnisse beobachtet worden. [144, 145] Einige der Therapieformen lassen sich durch die Ergänzung von dendritischen Zellen als potente antigenpräsentierende Zellen verbessern. [21, 22, 146, 147]

1.6 Einführung in das LRAST-Behandlungsschema

Der Begriff LRAST ist ein Akronym für Lymphodepletion, Rekonstitution und Aktiv-Spezifische Tumorthherapie und beschreibt die Anwendung eines lymphodepletierenden, jedoch nicht myeloablativen Therapieregimes, gefolgt von der Gabe von kongenen Spenderimmunzellen. [148] Die zeitnahe Verabreichung einer Ganzzellvakzine stimuliert den adaptiven Arm des Immunsystems und soll die Bildung Tumorantigen-spezifischer T-Zellen begünstigen. [149]

Die Lymphopenie wird durch Cyclophosphamid (CTX) erzeugt. Dieses zählt zur Gruppe der Stickstoff-Senfgas-Verbindungen und wird als DNA-alkylierendes Zytostatikum unter

¹ EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor; VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

anderem zur Behandlung verschiedener hämatologischer und solider maligner Erkrankungen angewendet. [150] CTX wirkt sich auch auf gesunde Zellen aus und erzeugt ein Nebenwirkungsprofil, das vor allem die knochenmarksständigen hämatopoietischen Stammzellen betrifft. Dosisabhängig wurden Neutropenie und Lymphopenie, bis hin zur Thrombozytopenie und Anämie beobachtet. [119] Aufgrund seiner immunmodulatorischen Effekte und der vergleichsweise geringen Toxizität, findet CTX auch im Rahmen der Immuntherapie Anwendung. Die Auswirkungen sind dabei dosisabhängig. In präklinischen Studien wurden unterschiedliche Dosierungen des Medikamentes von 30 mg/kg bis 250 mg/kg intraperitoneal oder intravenös, in Kombination mit verschiedenen immuntherapeutischen Ansätzen untersucht. [150] Beobachtet wurden ein Zytokinsturm, eine Verbesserung der Antigenpräsentation, eine Reduktion der Anzahl regulatorischer T-Zellen und eine homöostatische Proliferation, in der es zu einem Wiederanstieg verschiedener Lymphozytenpopulationen, getrieben durch die Zytokine GM-CSF, IL-1 β , IL-2, IL-7, IL-12, IL-15 und IL-21, kommt. Die homöostatische Proliferation von T-Zellen lässt auch T-Zellklone expandieren, die Tumorantigene erkennen und zu einer effektiven Tumorbekämpfung beitragen. [119, 150, 151]

In lymphatischen Organen entsteht nach CTX-Anwendung „Platz“ für neue, bzw. neu expandierte Immunzellen. [152] Die Wahrung der Homöostase bewirkt einen natürlichen proliferativen Anreiz für naive Immunzellen, die sich in den lymphatischen Organen anreichern. [22, 148] Die verstärkte Expression von Zytokinen unterstützt die homöostatische Proliferation und das Immunzell*homing* [149], sodass die im Anschluss an die Zytopenieinduktion i.v. transferrierten kongenen Spenderleukozyten optimale Bedingungen vorfinden.

Durch die Anwendung einer aktiv-spezifischen Tumorstimmung soll eine systemische Immunreaktion gegen die Tumorzellen ausgelöst werden. [148] Dabei wird die immunologische Wirkung des Glykoproteins und Zytokins GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor) genutzt, das als Adjuvanz Verwendung in diversen immuntherapeutischen Ansätzen findet. Es handelt sich um einen Wachstumsfaktor, der im Allgemeinen die Differenzierung und Proliferation von Granulozyten und Makrophagen aus hämatopoetischen Stammzellen bewerkstelligt und zu einer verstärkten Lokalreaktion mit Beteiligung von Dendritischen Zellen, Makrophagen und Granulozyten und damit zu einer verbesserten Präsentation von Tumorantigenen beiträgt. [136, 153] Stabil transduzierte, GM-CSF sezernierende D5-Tumorzellen werden bestrahlt und als Vakzine subkutan (s.c.) injiziert. Durch den erhöhten GM-CSF-Spiegel an der Vakzinierungsstelle kommt es zur vermehrten Rekrutierung und Reifung von APC und somit zu einer verstärkten Aktivierung

tumorspezifischer T-Zellen in den Vakzine-drainierenden Lymphknoten. So entsteht eine tumorspezifische und lange andauernde Immunreaktion. [136, 154] In einer Reihe präklinischer und klinischer Studien konnte auf diese Weise eine Immunität gegen den Tumor aufgebaut werden. [154-158] Arca et al. konnten zeigen, dass adoptiv verabreichte T-Zellen aus Vakzine-drainierenden Lymphknoten nach Vakzinierung mit GM-CSF produzierenden B16-BL6-Melanomzellen (450 ng GM-CSF / 24h / 1×10^6 Zellen) zu einer Reduktion etablierter pulmonaler Metastasen des B16-BL6-Melanoms führen. Verglichen mit T-Zellen aus den nativen tumordrainierenden Lymphknoten war die IFN- γ Ausschüttung nach Stimulation mit anti-CD3 monoklonalen Antikörpern und Expansion mit IL-2, erhöht. [159] Auch Dranoff *et al.* untersuchten syngene C57BL/6 Mäuse, die mit 5×10^5 bestrahlten und GM-CSF-produzierenden B16-Melanomzellen immunisiert und 1-2 Wochen später mit 1×10^6 Wildtyp-B16-Zellen im Form einer s.c. Gabe konfrontiert wurden. Hiernach zeigte sich eine 90 %-ige Überlebensrate der tumortragenden Mäuse. Im Vergleich hierzu erzielte beispielsweise eine IL-2 sezernierende Tumervakzine, bei Anwendung im gleichen Tiermodell, keinen Schutz. [136, 155]

Tumorassoziierte Antigene, sind beim Melanom und auch bei anderen Tumorarten schwache Selbst-Antigene. [152] Im Normalfall werden die hochaffinen tumorspezifischen T-Zellen im Rahmen der negativen Selektion im Thymus ausgemustert. Die Hypothese von Grossmann und Paul gibt eine Erklärung, wie das Immunsystem dennoch dazu gebracht werden kann das als Selbst erkannte zu bekämpfen. [160] Die Autoren gehen davon aus, dass in Folge eines abnormalen Zustandes, wie beispielsweise einer Lymphopenie, die Aktivierungsschwelle von selbstreaktiven T-Zellen sinkt, sodass das sonst unterdrückte T-Zell-Repertoire, bestehend aus autoreaktiven Zellen, auch ohne vorhandenes Antigen expandieren kann. Bietet man in der Phase der homöostatischen Proliferation Tumorantigene, zum Beispiel im Rahmen einer Vakzine an, könnte vorzugsweise die Subgruppe der tumorspezifischen T-Zellen die frei gewordenen Nischen der lymphatischen Organe besiedeln. Auch die Abnahme von Treg infolge niedrig dosierten Cyclophosphamids unterstützt diesen Ansatz. [148, 161-163]

2. Ziele der Doktorarbeit

Lymphodepletion, Immunzellrekonstitution und aktiv-spezifische Tumorzellvakzinierung (LRAST) verbesserten die systemische tumorgerichtete Immunantwort im mGC8-Magentumormodell. [148] Die Therapie war begleitet von einem Anstieg CD11b⁺ Gr-1⁺ Zellen, die als myeloide Suppressorzellen die Bildung und Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen eindämmen können. [148, 164]

In dieser Arbeit sollten anhand des orthotopen murinen D5-Melanommodells folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- 1) können vermehrt MDSC nach LRAST in Blut, Milz und Tumor von Mäusen mit etabliertem D5-Tumor nachgewiesen werden;
- 2) wird ein relevanter Anteil an MDSC durch den Immunzelltransfer bei der Rekonstitution übertragen;
- 3) hemmen MDSC die Induktion tumorspezifischer T-Zellen;
- 4) können MDSC mit einem monoklonalen Antikörper erfolgreich depletiert werden;
 - a) verbessert sich dadurch die Induktion tumorspezifischer Zellen?
 - b) kann ein verzögertes Tumorwachstum im Sinne einer gesteigerten Effektivität tumorspezifischer T-Zellen beobachtet werden?

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Mäusstämme

Für die Versuche wurden weibliche C57BL/6 Wildtyp (WT, $Ptprc^b = CD45.2^+$) Mäuse (Charles River Laboratories International, Inc., Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Als Milzzellspender dienten kongene C57BL/6-CD45.1⁺ ($Ptprc^a$) Mäuse mit der Bezeichnung B6.SJL- $Ptprc^a$ $Pepc^b$ /BoyCrl (Charles River Laboratories International, Inc., Calco, Italien). Die Mäuse wurden entsprechend den erweiterten FELASA-Kriterien gehalten. Pro Käfig hielten sich maximal 5 Mäuse bei einem Tag-Nachtrhythmus von 12 Stunden auf. Die Fütterung erfolgte ad libitum. Alle Mäuse waren bei Versuchsstart 8-12 Wochen alt. Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

3.1.2 Tumorzelllinien

Tab. 1: Tumorzelllinien.

| Bezeichnung | Zelltyp | Medium | Referenz |
|-------------|---|---------------|------------|
| D5 | Subklon des murinen Melanoms B16BL/6 | DMEM mit | |
| | | - 10 % FBS | [165] |
| | | - 1 % NaPyr | [159] |
| | | - 1 % NEAA | |
| | | - 2 % L-Glu | |
| D5G6 | Mit GM-CSF stabil transduzierter D5-Klon (retroviraler MFG-Vektor) | DMEM mit | |
| | | - 10 % FBS | [165] |
| | | - 1 % NaPyr | [159] |
| | | - 1 % NEAA | |
| | | - 2 % L-Glu | |
| LLC1 | Zelllinie des Lewis Lung Carcinoma (murines Lungenkarzinom) | DMEM mit | |
| | | - 10 % FBS | [166] |
| | | - 1 % NaPyr | |
| | | - 1 % NEAA | |
| | | - 2 % L-Glu | |
| mGC8 | Zelllinie aus CEA424-SV40 TAg- transgenen Mäusen (57BL/6-Tg (CEACAM5-Tag) L5496Wzm) mit spontan auftretenden Magen- tumoren | RPMI 1640 mit | |
| | | - 10 % FBS | [148, 167, |
| | | - 2 % NaPyr | 168] |
| | | - 2 % NEAA | |
| | | - 2 % L-Glu | |

| | | | |
|--------|---|--------------------------------|------------|
| | | - 0,1 % β - Mercaptoethanol | |
| MCA310 | 3-methylcholanthrene-induziertes murines Fibrosarkom aus der C57BL/6J-Mauslinie | RPMI 1640 mit | |
| | | - 10 % FBS | |
| | | - 2 % NaPyr | |
| | | - 2 % NEAA | [148, 169] |
| | | - 2 % L-Glu | |
| | | - 0,1 % β - Mercaptoethanol | |

Abkürzungen: DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium (Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, USA); RPMI 1640, Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (BioWhittaker, Lonza; Basel, Schweiz); FBS, Fetal Bovine Serum (Biochrom AG; Berlin, Deutschland); NaPyr, Natriumpyruvat (BioWhittaker, Lonza); NEAA, Non-Essential Amino Acid (BioWhittaker, Lonza); L – Glu, L – Glutamin (BioWhittaker, Lonza); β – Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, USA).

3.1.3 Verbrauchsmaterial für Zellkultur, Labor und Tierversuche

Tab. 2: Verbrauchsmaterial für Zellkultur, Labor und Tierversuche.

| Produkt | Hersteller |
|---|---|
| 1- und 12-Kanal Pipetten | Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) |
| 12-Kanal Plattenwascheinrichtung (Nunc-Immuno™ Wash) | Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA), Nunc-Immuno |
| 50 ml Zentrifugenröhrchen, konisch | BD (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA), Falcon |
| 15 ml Zentrifugenröhrchen, konisch | TPP AG (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz) |
| 96-Well Platten (MaxiSorp), flat bottom, mit Deckel | Thermo Fisher Scientific, Nunc |
| 96-Well Platten, U-bottom, mit Deckel | Thermo Fisher Scientific, Nunc |
| 48-Well Platten, flat bottom, mit Deckel | Corning, Inc., Costar |
| 24-Well Platten, flat bottom, mit Deckel | Thermo Fisher Scientific Nunc |
| 40 μ m / 100 μ m Zellsieb, steril | Corning, Inc., Falcon |
| 1 ml / 2 ml / 5 ml Spritzen, steril | BD |
| Abdeckfolie | Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA), BRAND |
| Einfrier-Röhrchen 1,8 ml (CryoTubes) | Thermo Fisher Scientific, Nunc |
| Einfrier-Behälter, "Mr. Frosty" | Thermo Fisher Scientific, Nalgene |
| Einmal-Sicherheitsskalpelle #22, Carbon Steel, steril | Braun Aesculap (Tuttlingen, Deutschland) |
| Kanülen 20 G, steril | BD Microlance 3 |

| | |
|--|--|
| Kanülen 27 G, steril | Braun (100 Sterican) (Melsungen, Deutschland) |
| Kanülen 30 G, steril | Braun (100 Sterican) |
| Mikrozentrifugenröhrchen: 0,5 ml / 1,5 ml / 2,0 ml | Eppendorf AG, safe-lock |
| Neubauer Zählkammer | Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) |
| Petrischalen mit Deckel, 100 x 20 mm | Corning, Inc. |
| Pipettenspitzen: 0,5 – 20 µl / 2 – 200 µl / 50 – 1000 µl | Eppendorf AG |
| Serologische Pipetten: 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml | Corning, Inc., Costar, Stripette |
| Sterile Schere | Braun Aesculap |
| Sterile Pinzette | Braun Aesculap |
| Zellkultur-Flasche 25, 75, 175 cm ² | Thermo Fisher Scientific, Nunc |

3.1.4 Lösungen, Medien und biologische Reagenzien für die Zellkultur

Tab. 3: Lösungen, Medien und biologische Reagenzien für die Zellkultur.

| Produkt | Hersteller |
|---|--------------------------------------|
| β-Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich |
| BSA | Biomol GmbH (Hamburg, Deutschland) |
| Deoxyribonuclease I | Sigma-Aldrich |
| DMEM, steril filtriert, ohne L-Glutamin, mit 4,5 g/l Glukose | BioWhittaker, Lonza (Basel, Schweiz) |
| DMSO Hybri-Max, steril filtriert | Sigma-Aldrich |
| D-PBS, ohne Calcium, ohne Magnesium | PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland) |
| EDTA-Trypsin (0,02 % EDTA, 0,02 % Trypsin), in PBS ohne Calcium / Magnesium, steril filtriert | PAN Biotech |
| FBS | Biochrom AG (Berlin, Deutschland) |
| Gentamicin | Sigma-Aldrich |
| HBSS rot und weiß, steril filtriert | BioWhittaker, Lonza |
| Heparin-Natrium Braun 25.000 IE / 5ml | Braun |
| Hyaluronidase Typ IV-S | Sigma-Aldrich |
| Kollagenase | Sigma-Aldrich |
| L-Glutamin (200 mM in 0,85 % NaCl Solution) | BioWhittaker, Lonza |
| Na-Pyruvate 100 mM Solution | BioWhittaker, Lonza |
| NEAA 100x, steril filtriert | BioWhittaker, Lonza |
| RPMI 1640, steril filtriert | BioWhittaker, Lonza |

Abkürzungen: BSA, Bovines Serumalbumin; DMSO, Dimethylsulfoxid; (D-) PBS, (Dulbeccos'-s-) Phosphate-Buffered Saline; EDTA, Ethylene Diamine Tetraacetic Acid; HBSS, Hanks' Balanced Salt solution.

3.1.5 Sonstige Chemikalien

Tab. 4: Sonstige Chemikalien.

| Produkt | Hersteller |
|--|--|
| Ethanol 80 % (vollständig vergällt) | CLN GmbH (Niederrhummel, Deutschland) |
| Forene 100 % V/V (Isofluran) | Abbott GmbH & Co.KG (Wiesbaden, Deutschland) |
| H ₂ SO ₄ (1 M) | Sigma-Aldrich |
| KCl | Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) |
| KH ₂ PO ₄ | Merck KGaA |
| NaCl | Sigma-Aldrich |
| Na ₂ CO ₃ | Sigma-Aldrich |
| NaHCO ₃ | Sigma-Aldrich |
| Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O | Merck KGaA |
| NaN ₃ | Sigma-Aldrich |
| Trypanblau | Sigma-Aldrich |
| Tween 20 | Merck KGaA |

Abkürzungen: H₂SO₄, Schwefelsäure; KCl, Kaliumchlorid; KH₂PO₄, Kaliumdihydrogenphosphat; NaCl, Natriumchlorid; Na₂CO₃, Natriumcarbonat; NaHCO₃, Natriumhydrogencarbonat; Na₂HPO₄, Natriumhydrogenphosphat; H₂O, Wasser (2H₂O: -dihydrat); NaN₃, Natriumazid.

3.1.6 Rezepturen für Lösungen und Puffer

Tab. 5: Rezepturen für Lösungen und Puffer.

| Produkt | Zusammensetzung |
|------------------------------|--|
| 10x PBS, pH 7,4 | 80 g NaCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O 1,92 g KH ₂ PO ₄ 2 g KCl Ad 10 Liter H ₂ O (nach Millipore™-Membranfiltration), pH 7.4 |
| 0.1 M Carbonatpuffer, pH 9.5 | 0,84 g NaHCO ₃ 0,356 g Na ₂ CO ₃ Ad 100 ml H ₂ O (nach Millipore™ - Membranfiltration), pH 9.5 |
| Einfriermedium | 90 % 1x FBS |

| | |
|---------------------------------------|---|
| | 10 % DMSO |
| ELISA-Waschpuffer | 0.05 % Tween-20 in PBS, pH 7.4 |
| ELISA Assay Diluent | 1 % BSA in PBS |
| ELISA Blockierlösung | 2 % BSA in PBS |
| Erylyse-Puffer | 8,3 g NH ₄ Cl 1,0 g KHCO ₃ 0,0372 g EDTA Ad 1,0 Liter H ₂ O (nach Millipore™- Membranfiltration), pH 7.4, autoklaviert |
| FACS-Puffer | 1 Liter PBS (1x) mit - 5 g BSA → 0,05 % Endkonzentration - 2 ml NaN ₃ (10 % Natriumazid) → 0,02 % Endkonzentration |
| Tumorverdaupuffer (1x Enzymlösung) | - 70 % RPMI 1640 mit 2x Gentamicin - 10 % 10x DNase - 10 % 10x Collagenase - 10 % 10x Hyaluronidase |

Abkürzungen: NH₄Cl, Ammoniumchlorid; Erylyse-Puffer, Puffer zur Lyse von Erythrozyten; FACS, Fluorescence-activated Cell Sorting.

3.1.7 Zusätzliches für die Durchflusszytometrie

Tab. 6: Zusätzliches für die Durchflusszytometrie.

| Produkt | Hersteller |
|--|--|
| 7-AAD | BioLegend (San Diego, Kalifornien, USA) |
| Annexin V PE | BioLegend |
| Annexin V Binding Buffer 10x Concentrate, 50 ml | BioLegend |
| Anti-mouse IgGκ / Negative Control Compensation Particle Set (BD CompBeads) | BD Bioscience |
| FACS-Tubes 5 ml (12x75 mm) | BD Falcon |
| Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (Mouse BD Fc-Block 2.4G2) | BD Pharmingen |
| Zombie Yellow Fixable Viability Kit | BioLegend |

Abkürzungen: 7-AAD, 7-Aminoactinomycin D; PE, Phycoerythrin; IgG, Immunglobulin G.

3.1.8 Cytokine (IFN-γ) Release Assay und IFN-γ- ELISA

Tab. 7: Cytokine (IFN-γ) Release Assay und IFN-γ-ELISA.

| Produkt | Hersteller |
|------------------|---|
| 2C11 (anti-mCD3) | Zur Verfügung gestellt von: H. M. Hu, Portland, Oregon |

| | |
|--|---|
| Capture antibody anti-mouse IFN- γ (2 ml, 500 μ g/ml) | BD, Pharmingen |
| Detektionsantikörper anti-mouse IFN- γ biotin (1 ml, 500 μ g/ml) | BD, Pharmingen |
| IL-2 (Proleukin) | Chiron (Emeryville, Kalifornien, USA) |
| Recombinant murine IFN- γ (Stock 10 μ g/ml) | Peprotech (Rocky Hill, New Jersey, USA) |
| Reagenz A (H ₂ O ₂) and Reagenz B (TMB) (Substrate Reagent Set) | BD, Pharmingen |
| Streptavidin-HRP | BD, Pharmingen |

Abkürzungen: m-, mouse (anti-mCD3, anti-mouse CD3); TMB, Tetramethylbenzidin; HRP, Horse Radish Peroxidase.

3.1.9 Laborgeräte

Tab. 8: Laborgeräte.

| Gerät | Hersteller | Bezeichnung |
|--|--|--------------------------|
| Durchflusszytometer | BD | FACS-Calibur |
| | BD | BD™ LSR II |
| ELISA reader, Filter 450 nm und 570 nm | Tecan (Männedorf, Schweiz) | Spectra Fluor (IV420040) |
| Kühlschrank 4 °C | Liebherr (Bulle, Schweiz) | Profi Line |
| Gefrierschrank -20 °C | Liebherr | Öko Super |
| Gefrierschrank -40 °C | Liebherr | Öko Super |
| Gefrierschrank -80 °C | Thermo Fisher Scientific Heraeus | HERAfreeze |
| Kühlzentrifuge 1 | Hettich (Tuttlingen, Deutschland) | Rotina 420R |
| Kühlzentrifuge 2 | Hettich | Rotina 48R |
| Kühlzentrifuge 3 | Eppendorf AG | Eppendorf 4517R |
| Magnetrührer | IKA (Staufen, Deutschland) | Combimag RCO |
| Mikroskop 1 | Leitz (Wetzlar, Deutschland) | Laborlux S |
| Mikroskop 2 | Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena, Deutschland) | ID03 |
| Mini-Zentrifuge | Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland) | Sprout |
| pH-Meter | Knick (Berlin, Deutschland) | Portamess |
| Pipettierhelfer | Brand GmbH + CO KG (Wertheim, Deutschland) | Accu-Jet pro |
| Sterilbank | Heraeus (Hanau, Deutschland) | Hera safe |
| Stickstofftonne | Air Liquide S.A. (Paris, Frankreich) | |

| | | |
|---------------------|---|---------------|
| Vortexer | Labnet International, Inc. (Edison, New Jersey, USA) | VX100 |
| Wasserbad | Julabo GmbH (Seelbach, Deutschland) | Julabo MB-BRÜ |
| Zellkulturinkubator | Binder GmbH (Tuttlingen, Deutschland) | CB210 |

3.1.10 Antikörper

Tab. 9: Primär- und Sekundärantikörper.

| Primärantikörper | Klon | Konjugation | Isotyp | Firma |
|--------------------------------|-------------|--------------|----------------------|---|
| CD44 anti-mouse/human | IM7 | APC | Rat IgG2b κ | eBioscience (Frankfurt am Main, Deutschland) |
| CD3ε anti-mouse | 145-2C11 | APC/Cy7 | Armenian Hamster IgG | BioLegend |
| Ly6G anti-mouse | 1A8 | APC/Cy7 | Rat IgG2a κ | BioLegend |
| Ly6G/Ly6C (Gr-1) anti-mouse | RB6-8C5 | APC/Cy7 | Rat IgG2b κ | BioLegend |
| CD8a anti-mouse | 53-6.7 | APC | Rat IgG2a κ | BioLegend |
| CD45.1 anti-mouse | A20 | APC | Mouse (A.SW) IgG2a κ | BioLegend |
| Ly6C anti-mouse | HK1.4 | APC | Rat IgG2c κ | BioLegend |
| CD45.2 anti-mouse | 104 | FITC | Mouse (SJL) IgG2a κ | BioLegend |
| I-A/I-E (MHC-II) anti-mouse | M5/114.15.2 | Pacific Blue | Rat IgG2b κ | BioLegend |
| CD45R/B220 anti-mouse/human | RA3-6B2 | Pacific Blue | Rat IgG2a κ | BioLegend |
| CD62L anti-mouse | MEL-14 | PE | Rat IgG2a κ | BioLegend |
| CD3 ε anti-mouse | 145-2C11 | PE | Armenian Hamster IgG | BioLegend |
| Ly6G anti-mouse | 1A8 | PE | Rat IgG2a κ | BioLegend |

| | | | | |
|--|-------------|--------------------|----------------------|---------------|
| CD4 anti-mouse | GK1.5 | PE/Cy7 | Rat IgG2b κ | BioLegend |
| CD8a anti-mouse | 53-6.7 | PE/Cy7 | Rat IgG2a κ | BioLegend |
| CD11b anti-mouse/human | M1/70 | PE/Cy7 | Rat IgG2b κ | BioLegend |
| CD45.1 anti-mouse | A20 | PerCP/Cy5.5 | Mouse (A.SW) IgG2a κ | BioLegend |
| Ly6G anti-mouse | 1A8 | APC/Cy7 | Rat IgG2a κ | BioLegend |
| CD16/CD32 Fc-Block 2.4G2) anti-mouse | 2.4G2 | unkonjugiert | Rat IgG2b κ | BD Pharmingen |
| Sekundärantikörper | Klon | Konjugation | Isotyp | Firma |
| Goat IgG anti-rat | Poly4054 | PE | Goat Polyclonal IgG | BioLegend |

Abkürzungen: APC, Allophycocyanin; APC/Cy7, Allophycocyanin / Cyanine 7; FITC, Fluoresceinisothiocyanat; PE, Phycoerythrin; PE/Cy7, Phycoerythrin / Cyanine 7; PerCP/Cy5.5, Peridinin-Chlorophyll Protein / Cyanine 5.5

Tab. 10: Isotyp-Kontrollen.

| Isotyp Kontrollen | Klon | Konjugation | Firma |
|--------------------------|-------------|--------------------|----------------|
| Mouse IgG1 κ | MOPC-21 | Alexa Fluor 647 | BioLegend |
| Mouse IgG2a κ | MOPC-173 | PerCP/Cy5.5 | BioLegend |
| Rat IgG1 κ | RTK2071 | Alexa Fluor 647 | BioLegend |
| Rat IgG1 κ | RTK2071 | PE | BioLegend |
| Armenian Hamster IgG | HTK888 | APC/Cy7 | BioLegend |
| Rat IgG2a κ | RTK2758 | APC | BioLegend |
| Rat IgG2a κ | RTK2758 | PE/Cy7 | BioLegend |
| Rat IgG2b κ | RTK4530 | APC | BioLegend |
| Rat IgG2b κ | RTK4530 | Pacific Blue | BioLegend |
| Rat IgG2b κ | RTK4530 | PE/Cy7 | BioLegend |
| Rat IgG2c κ | RTK4174 | APC | BioLegend |
| Mouse IgG 2a κ | G155-178 | FITC | BD Biosciences |
| Mouse IgG 2a κ | G155-178 | PE | BD Biosciences |
| Rat IgG2b κ | A95-1 | PE | BD Biosciences |
| Rat IgG2a κ | R35-95 | PE | BD Biosciences |

3.1.11 MDSC-Depletion

Der für die Depletion myeloider Suppressorzellen verwendete Antikörper, sowie die Isotypkontrolle hierzu wurden freundlicherweise von Dr. Louis Boon (Head of CLG, Bioassay and Process Development, EPIRUS Biopharmaceuticals, Inc., Boston, Massachusetts; zuvor: Chief Scientific Officer, Bioceros B.V., Utrecht, Niederlande) zur Verfügung gestellt.

Tab. 11: Antikörper für die MDSC-Depletion.

| Antikörper | Konjugation |
|---|--------------|
| Anti-Gr-1 mAk (Klon RB6-8C5, Isotyp: Ratte IgG2b κ) | unkonjugiert |
| Anti-Phyt IgG2b AFRC MAC 51 | unkonjugiert |

Abkürzungen: Phyt, Phytochrom; mAk, monoklonaler Antikörper.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkulturmethoden

3.2.1.1 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung und Expansion der Zellen erfolgte in entsprechendem Zellkulturmedium in einem Inkubator, der eigens für murine Zelllinien abgestellt war. Dieser bot mit einer Temperatur von 37 °C und einer Insufflation von 5 % CO₂ optimale Bedingungen für das Zellwachstum.

3.2.1.2 Ablösen adhärenter Zellen

Adhärenente Zellen wurden einmal mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml Trypsin bedeckt (jeweils für 175 cm² Zellkulturflaschen). Zum Einwirken des Trypsins wurden die Zellen bei 37 °C im Zellkulturinkubator belassen. Bei Erreichen einer ausreichenden Ablösung der Zellen vom Flaschenboden wurde die Trypsinierung mit 10 ml Zellkulturmedium gestoppt und die Zellsuspension in Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach Zentrifugation (450 \times g, 5 min, 20 °C) wurden die Zellen in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert und nach Entnahme einer Zählprobe in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Nun konnten die Zellen zur Weiterkultivierung oder für Experimente verwendet werden.

3.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl einer Zellsuspension erfolgte aus einem bekannten Volumen (z.B. 10 ml). Die entnommene Zählprobe aus der Suspension wurde je nach erwarteter Zellzahl im Verhältnis 1:5, 1:10 oder 1:20 mit Trypanblau vermischt und das Gemisch in eine davor zur Zellzählung präparierte Neubaur-Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop konnten so bereits apoptotische Zellen (blau) von vitalen Zellen (ungefärbt, transparent) unterschieden

werden. Die Zellkonzentration in Zellen pro Milliliter, bzw. die absolute Zellzahl des jeweiligen Volumens wurde nach der folgenden Formel berechnet.

Zellkonzentration (Zellen pro ml)=

$$\frac{\text{Gesamtzellzahl (vitaler Zellen) aus allen gezählten Quadranten} \times \text{Umrechnungsfaktor } 10^4}{\text{Anzahl gezählter Quadranten}}$$

Zellzahl=

$$\frac{\text{Gesamtzellzahl aller gezählten Quadranten} \times \text{Volumen der Zellsuspension [ml]} \times \text{Umrechnungsfaktor } 10^4}{\text{Anzahl gezählter Quadranten}}$$

3.2.1.4 Einfrieren von Zellen

Für die Langzeitlagerung wurden die zuvor kultivierten, oder aus dem Versuchstier entnommenen und aufbereiteten Zellen in flüssigem Stickstoff (-196 °C) eingefroren. Hierzu wurde die Zellsuspension nach Bestimmung der Zellzahl herunterzentrifugiert (450 x g, 5 min, 20 °C). Anschließend wurde das Zellpellet in Einfriermedium resuspendiert und je nach Zellart $\pm 20 \times 10^6$ Zellen auf jedes Einfrier Röhrchen verteilt. Durch zügiges Arbeiten wurde ein Zellschaden durch den Einfrierprozess minimiert. Die Röhrchen wurden für 24 Stunden in einem Einfrierbehälter („Mr. Frosty“) bei -80 °C gelagert und dann in Behälter mit flüssigem Stickstoff überführt.

3.2.1.5 Auftauen von Zellen

Bei -196 °C gelagerte Einfrier Röhrchen wurden zuerst für 10 - 20 Minuten bei -80 °C zwischengelagert. Danach erfolgte ein rasches Auftauen der Zellsuspension durch Schwenken in einem Wasserbad mit 37 °C, bis ca. 90 % der Zellsuspension aufgetaut war. Die aufgetauten Zellen wurden nun in eine entsprechende Zellkulturflasche mit vorgelegtem Medium überführt oder für durchflusszytometrische Versuche weiterverarbeitet.

3.2.1.6 Gewinnung von Einzelzellsuspensionen aus Geweben/Organen der Maus

Zur Organentnahme bei Versuchsende oder zur Gewinnung der CD45.1⁺ Milzzellen aus naiven Spendermäusen wurden die Tiere durch zervikale Dislokation nach einer Inhalationsnarkose mit Isofluran getötet (gemäß §4 Tierschutzgesetz). Nach Desinfektion wurde das Fell der Versuchstiere ventral abpräpariert und der Situs eröffnet. Die sorgfältige Präparation und Entnahme der Organe erfolgten unter möglichst aseptischen Bedingungen mit steriler Schere und Pinzette.

a) Blut

Die repetitive Blutentnahme an der lebenden Maus vor Versuchsende erfolgte durch Abtrennen der Hautkappe (max. 1 mm) an der Schwanzspitze. Austretendes Blut wurde mit heparinbeschichteten Kapillaren aufgenommen und in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen transportiert. Pro Maus wurden maximal 5 Kapillaren á 20 µl, entsprechend 100 µl Blut auf einmal entnommen.

Für die finale Blutentnahme wurde das freipräparierte Herz oder die große Hohlvene mit einer großlumigen Kanüle punktiert. Es wurden 0,5 – 1,0 ml Blut in eine 1,0 ml-Spritze mit 50 µl vorgelegtem Heparin aspiriert und mit diesem durchmengt.

Bis zur Weiterverarbeitung wurde das gewonnene Blut auf Eis transportiert. Um eine Lyse der Erythrozyten zu erzielen, wurde das Blut mit Lyse-Puffer für 5 Minuten inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen (Zentrifugation: 350 x g, 5 min, 4 °C).

b) Milz und Lymphknoten

Die Milz, sowie die axillären und inguinalen Lymphknoten wurden mit sterilem Präparationsbesteck, bestehend aus Schere und Pinzette, vorsichtig und unter Schonung der gewünschten Organe freipräpariert und in PBS mit 1 % FBS auf Eis transportiert.

Die Gewinnung von Einzelzellsuspensionen dieser kapsulären Organe wurde schrittweise durchgeführt. Zunächst wurden die Milzen, nicht aber die Lymphknoten, mit einer sterilen Schere in 3-5 Teile zerteilt. Die weitere feinere Auftrennung der Milzstücke und Lymphknoten erfolgte durch Dissezieren mittels zweier 20 G – Kanülen. Der letzte Schritt bestand aus dem Verreiben der kleinen Organstücke mit der Stempelseite einer 5 ml-Spritze bei den Milzen und einer 2 ml-Spritze bei den Lymphknoten. Die Zellen wurden daraufhin in PBS / 1 %FBS aufgenommen und über einem 100 µm - Zellsieb gefiltert. Nach der Zellzahlbestimmung erfolgte ein weiterer Waschschrift mit PBS / 1 % FBS (Zentrifugationsschritte jeweils: 450xg, 5 min, 20 °C). Abschließend wurden die Zellen eingefroren, oder für eine intravenöse Verabreichung (Milzzellen), für einen Cytokine-Release-Assay (Lymphknotenzellen) oder für die durchflusszytometrische Analyse (Milz- und Lymphknotenzellen) weiterverarbeitet. Für die Durchflusszytometrie wurde mit der Milzzellsuspension analog zum Blut eine Erythrozytenlyse durchgeführt (siehe oben).

c) Tumor

Die subkutan gelegenen Tumoren wurden vorsichtig unter Schonung der Tumorkapsel und ohne Mitnahme von Haut oder Nachbarorganen freipräpariert und in PBS / 1 %FBS auf Eis transportiert. Nach sorgfältiger Zerkleinerung des Gewebes mittels zweier Skalpelle erfolgte

der Tumorverdau in einem 1 x Triple-Enzyme-Tumorverdaupuffer bestehend aus DNase, Kollagenase und Hyaluronidase in Gentamicin-haltigem RPMI. Der Tumorverdau wurde 45 Minuten unter kontinuierlicher Durchmischung auf einem Magnetrührgerät durchgeführt und hiernach der Überstand über ein 100 µm Zellsieb gegeben. Auch das unverdaute Gewebe wurde abschließend mit der Stempelseite einer 5 ml – Spritze auf dem gleichen Zellsieb ausgedrückt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (1500xg, 5 min, 20 °C) und zur Zellzahlbestimmung in RPMI-Medium aufgenommen.

3.2.2 Murines Tumormodell

D5-Melanomzellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase abgelöst und drei Mal in HBSS-weiß gewaschen (450 x g, 5 min, 20 °C). Für die Injektion wurde die Zellzahl auf 5×10^4 pro 50 µl HBSS weiß eingestellt. In Versuchen zur Bestimmung der IFN-γ-Produktion tumordrainierender Lymphknotenzellen wurde vier Mal jeweils 50 µl der Zellsuspension extremitätennah subkutan injiziert. In Langzeitversuchen erfolgte eine einmalige subkutane Injektion von ebenfalls 50 µl in die jeweils rechte Flanke der Versuchstiere. Das Tumorstadium wurde jeden zweiten Tag mittels Schublehre erfasst und dokumentiert. Die Tumorstadium errechnete sich aus dem Produkt des jeweils größten und kleinsten Tumordurchmessers.

3.2.2.1 LRAST – Das Grundbehandlungsschema

Die Behandlungsschritte an den Versuchstieren bestanden aus den Komponenten Lymphodepletion (L) mit dem Alkylanz Cyclophosphamid, Immunrekonstitution (R) mit aus kongenen Mäusen gewonnenen CD45.1⁺ Milzzellen und einer aktiv-spezifischen Tumorstadium (AST) mit bestrahlten, GM-CSF-produzierenden D5-Melanomzellen (D5G6-Zellen).

Nach der s.c. Verabreichung der D5-Tumorstadium am Tag -3, erfolgte am Tag 0 eine subtotale Lymphodepletion mit 200 mg/kg Cyclophosphamid als intraperitoneale (i.p.) Injektion (Abb. 3, Tag 0). Am darauffolgenden Tag wurden 20×10^6 Milzzellen, die zuvor aus kongenen CD45.1⁺ Mäusen gewonnen wurden, in 100 µl HBSS durch Injektion in die laterale Schwanzvene rekonstituiert (Abb. 3, Tag 1). Im Anschluss wurden den Versuchstieren mit 10.000 Rad bestrahlte GM-CSF-produzierende Melanomzellen (D5G6) s.c. injiziert (Abb. 3, Tag 1). Die Zellzahl richtete sich nach dem Versuchsziel und betrug in Kurzzeitversuchen zur Bestimmung der IFN-γ-Produktion $5,0 \times 10^6$ Zellen pro 50 µl HBSS, injiziert an der gleichen Stelle wie die Tumorstadium. In Langzeitversuchen erhielten die Versuchstiere 10×10^6 Zellen in 50 µl HBSS weiß, jeweils als s.c. Injektion im Bereich der linken Flanke.

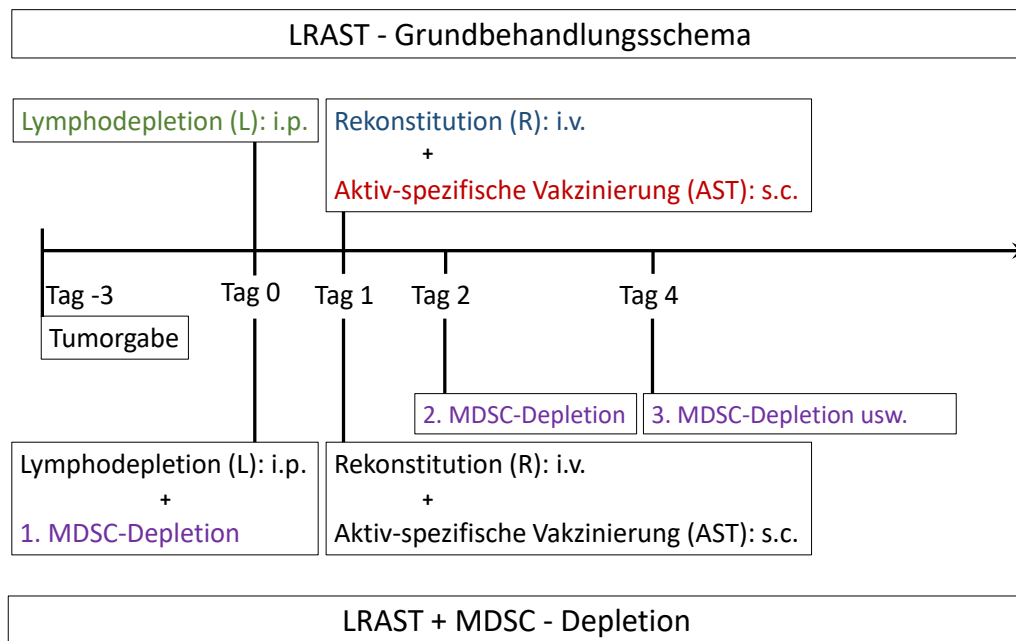


Abb. 3: LRAST-Grundbehandlungsschema mit Erweiterung um die MDSC-Depletion.

3.2.2.2 MDSC - Depletion

Das Grundbehandlungsschema (Abb. 3, oberer Teil) wurde in weiteren Versuchen um die Depletion von MDSC ergänzt (Abb. 3, unterer Teil). Hierfür wurde 230 µg eines anti-Gr-1 Antikörpers (Subklon RB6-8C5) alle 48 Stunden bis zum Versuchsende i.p. injiziert. Die erste Antikörpergabe erfolgte am Tag der Lymphodepletion (Tag 0). Kontrollgruppen erhielten eine äquivalente Dosis eines IgG2b-anti-Phytochrom Antikörpers aus der Ratte x Ratte Hybridom-Zelllinie AFRC MAC 51 (Myelom: Y3Ag1.2.3).

3.2.3 Immunologische Methoden

3.2.3.1 Theorie der Durchflusszytometrie

a) Allgemeine Methodik

Die Durchflusszytometrie dient der differenzierten Bestimmung und Quantifizierung von Zellen anhand ihrer Form und Größe, sowie der Oberflächenmoleküle oder intrazellulären Bestandteile. Es werden einerseits Streulichtsignale, die von der allgemeinen Zellbeschaffenheit abhängen, und andererseits Fluoreszenzsignale nach gezieltem Anfärben zellulärer Moleküle unterschieden und erfasst. Nahezu jedes Gewebe kann analysiert werden, solange die Herstellung einer Einzelzellsuspension möglich ist. [170, 171] Die insgesamt komplexe Methode bedient sich dabei weniger einfacher Grundlagen und basiert auf einem Durchflusssystem, einem optischen System und einem elektronischen System. Es werden zwei Arten von Durchflusszytometern unterschieden: Analysegeräte und Sorter, die Zellen mit bestimmten gewünschten Eigenschaften in sehr hoher Reinheit (>99 %) separieren können.

[172] Nachdem in der Anfangsphase in den späten 60-er Jahren nur drei Zellparameter (zwei Streulicht- und ein Fluoreszenzparameter) gemessen werden konnten, entwickelte sich die Methode über 4-Farbensysteme in den 80-er Jahren weiter bis zu Durchflusszytometern, die über 10 Farben, zuzüglich der beiden Streulichtparameter, messen konnten. Der aktuelle Stand der Technik ermöglicht mit der Unterscheidung von insgesamt 19 Parametern (2 Streulicht- und 17 Fluoreszenzparameter) einen äußerst detaillierten Einblick in das Immunsystem des untersuchten Organismus. [173] Im Folgenden wird nur auf die Analysefunktion in der Durchflusszytometrie eingegangen. Abb. 4 zeigt schematisch den Aufbau eines entsprechenden Gerätes. [174]

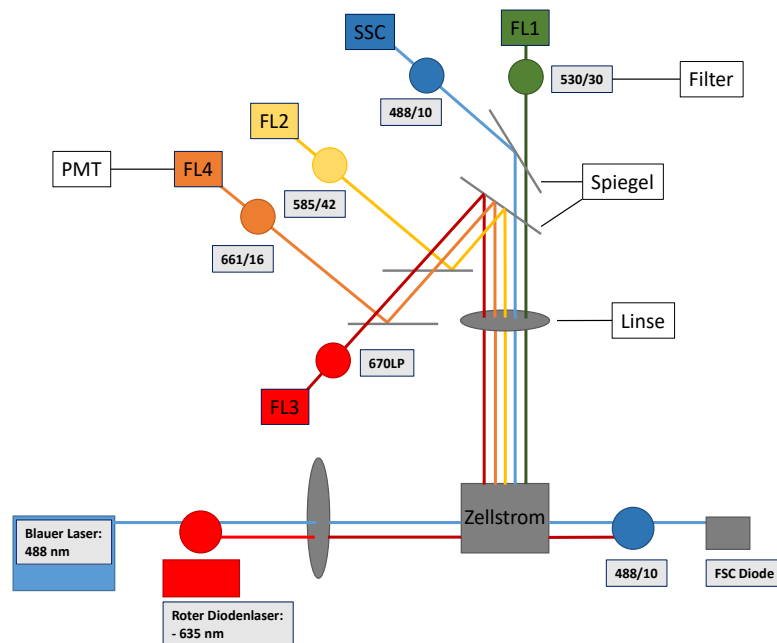


Abb. 4: Aufbau und Strahlengang eines Durchflusszytometers am Beispiel des FACS-Calibur. PMT, „photomultiplier-tube“ = Detektor. Adaptiert aus [174].

b) Grundzüge des Messvorgangs

Nach Herstellung einer Einzelzellsuspension können diverse Antigene oder Proteine der Zellen mit Fluorochrom-beladenen Antikörpern gefärbt werden. Die Probe wird zur Messung aus dem FACS-Röhrchen in das Gerät aspiriert. In einem Überdrucksystem bildet sich ein dünner Probenstrom der von einem Hüllstrom aus isotonischer Lösung (FACS Flow) umgeben ist (Abb. 5). Idealerweise reihen sich die Zellen im Probenstrom eine hinter die andere und passieren so einen im rechten Winkel zu ihnen ausgerichteten fokussierten Laserstrahl. Die charakteristischen Zelleigenschaften ergeben sich aus der Art, wie das einfallende Laserlicht gestreut wird, oder, falls die Zellen mit Fluorochromen beladen sind, wie absorbiertes Laserlicht emittiert wird (Abb. 4 und 5). [171, 175]

Gestreutes Licht wird in der Laserachse durch eine FSC- Photodiode (FSC = forward scatter, Vorwärtsstreulicht) und um 90° versetzt durch einen SSC-Detektor (SSC = side scatter, Seitwärtsstreulicht) gesammelt. Zusätzlich werden auch die Fluoreszenzemissionen im 90° - Winkel durch eine Reihe unterschiedlicher Detektoren erfasst, denen das seitlich gestreute und emittierte Licht durch ein System aus Spiegeln zugeführt wird. Die Detektoren werden *Photomultiplier – Tubes* oder PMT's genannt. Ihnen sind jeweils Filter vorgeschaltet, welche die gewünschte bzw. erwartete Lichtwellenlänge passieren lassen und einen Einfall von Störlicht verhindern. In den PMT's erzeugen die eintreffenden Lichtphotonen elektrische Signale, deren Signalstärke proportional zur gemessenen Menge an gestreutem Licht oder Fluoreszenzlicht ist. [175] Die Signale werden verstärkt und auf einem zugehörigen Computer als Kanalwert einer bestimmten Intensitätsstufe zugeordnet. Beim FACS-Calibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) zum Beispiel werden 1024 Kanäle gespeichert. Auf diese Weise werden für jede einzelne Zelle, die den Laserstrahl passiert, ihre Parameter erfasst. [171, 175]

c) Prinzip der Fluoreszenz

Durch die Markierung von Oberflächenproteinen (z.B. Proteine der CD - Klassifikation) können Zellen in einer Suspension identifiziert werden. Die Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit sie zu quantifizieren und phänotypisch, sowie funktionell weiter zu untersuchen. Dafür werden mit Farbstoffen, sogenannten Fluorochromen, gekoppelte Antikörper verwendet, die den markierten Zellen zur Fluoreszenz verhelfen und so die Detektion durch ein Durchflusszytometer erlauben. [170, 175]

Fluorochrome können durch eine Exzitationskurve und eine Emissionskurve charakterisiert werden. Beide Kurven weisen Wellenlängenbereiche mit maximaler Exzitation, bzw. Emission auf. Kommt es nun zur Passage einer einzelnen, durch Antikörperbindung Fluorochrom - markierten Zelle, durch den Strahlengang des Exzitationslasers, wird das Fluorochrom angeregt und emittiert Licht einer bestimmten Wellenlänge (Abb. 4 und 5). Je näher die Wellenlänge des Lasers zum Exzitationsmaximum des Farbstoffes liegt desto ausgeprägter ist demnach die Emission. Bei Überlappung und günstiger Lage der Exzitationsmaxima mehrerer Fluorochrome können diese auch durch einen einzigen Laser angeregt werden. Emittiertes Licht kann nun durch die PMTs registriert und die erzeugten elektrischen Signale gespeichert werden. [170, 175]

d) Wiedergabe der gemessenen Daten

Nach der Messung können die gespeicherten Daten mittels einer speziellen Software weiterverarbeitet und ausgewertet werden. Die Werte werden in der Regel logarithmiert in Ein-

Parameter Histogrammen (eindimensional), oder in Zwei-Parameter Dot-Plots (zweidimensional) ausgegeben. Die Achsen umfassen dabei vier bis fünf Zehnerpotenzen, also Fluoreszenzintensitätswerte, die sich um das 10.000- bis 100.000-fache unterscheiden. [176] Ziel ist es, unabhängig von der Darstellungsweise, Zellen mit gleichen Eigenschaften zu identifizieren, welche dann als Population bezeichnet werden können. Während in Histogrammen lediglich die Häufigkeit wiedergegeben wird, mit der eine bestimmte Fluoreszenzintensität auftritt, lassen sich mit zweidimensionalen Darstellungen (Punktwolkendarstellungen) Bezüge zwischen den Fluoreszenzparametern herstellen (Abb. 5). [171]

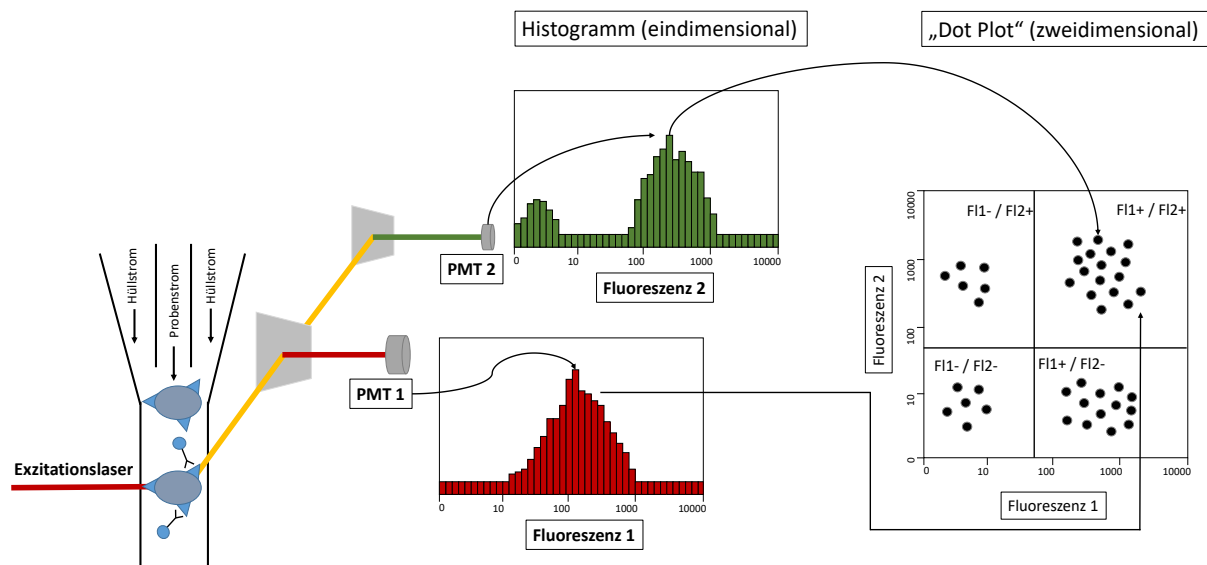


Abb. 5: Darstellungsweise von FACS-Daten.

Für die weitere Differenzierung einer Population können die Zellen in sogenannten „Gates“ zusammengefasst werden; hier zum Beispiel Zellen, die für Fluoreszenz 1 und Fluoreszenz 2 positiv sind (Abb 6, B, mittleres Plot). Es werden dabei Zellen mit den gewünschten Eigenschaften eingerahmt (*gating*) und somit von Zellen mit abweichenden Eigenschaften, die außerhalb des Gates liegen, unterschieden. Eine eingerahmte (*gated*) Zellpopulation kann dann in einer weiteren ein- oder zweidimensionalen Darstellung hinsichtlich zusätzlicher Fluoreszenzparameter weiter differenziert werden. Es besteht dabei die Möglichkeit der Farbkodierung dieser Population, die in weiteren Plots durch die zugeordnete Farbe von anderen Zellen unterschieden werden kann (Abb. 6, A). Die gated Population lässt sich jedoch auch in weiteren Plots isoliert von Zellen mit abweichenden Eigenschaften darstellen, sodass mit weiteren Fluoreszenzparametern nur Subpopulationen der ursprünglichen Zellwolke bestimmt werden (Abb. 6, B). [171, 175]

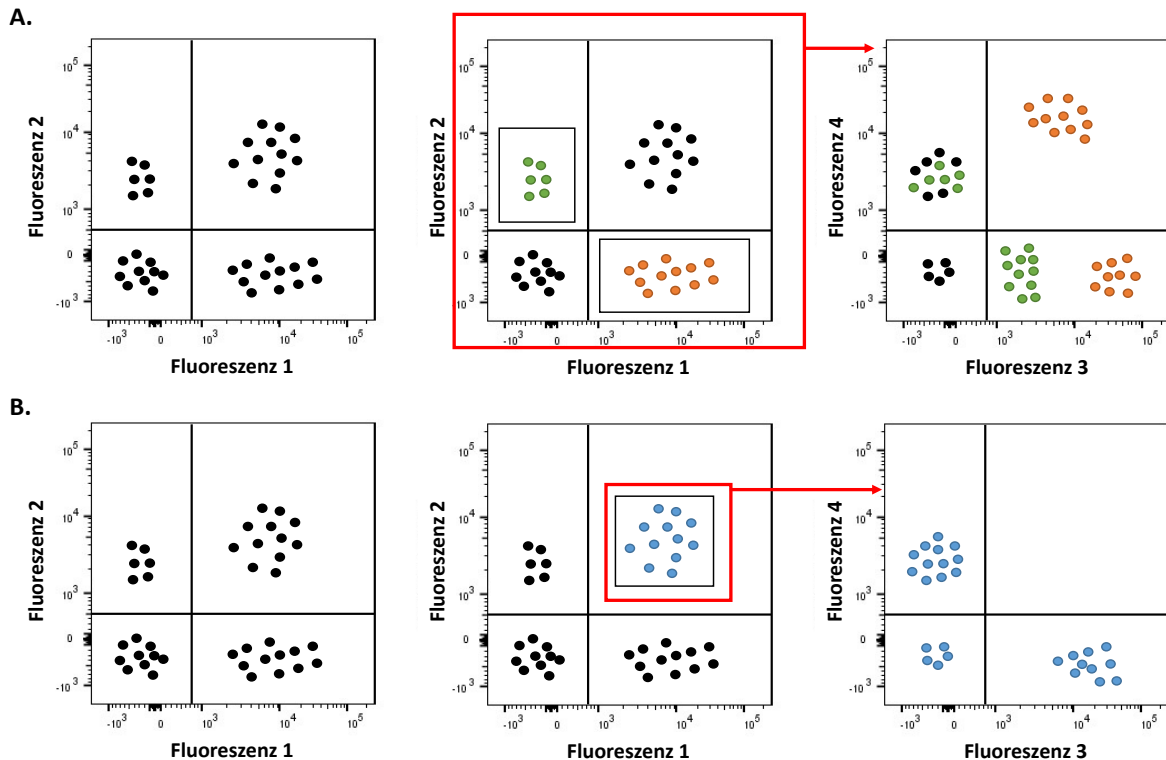


Abb. 6: Schematische Auswertung durchflusszytometrischer Daten.

3.2.3.2 Zellfärbung für die Durchflusszytometrie

1-2 x 10⁶ Zellen pro FACS-Röhrchen wurden mit FACS-Puffer gewaschen und in ca. 100 µl FACS-Puffer resuspendiert. Vor einer Anfärbung der Zellen mit dem Vitalfarbstoff Zombie Yellow (1:250 – 1:500 Verdünnung) wurde PBS anstelle von FACS-Puffer zum Waschen verwendet und für 25 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Waschschriff mit FACS-Puffer (Zentrifugation: 450 x g, 5 min, 20 °C) wurden die F_c-Rezeptoren mit anti-Maus CD16/CD32 blockiert (F_c-Block; 0,5 µg / 1 x 10⁶ Zellen, Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur). Nach einem weiteren Waschschriff mit FACS-Puffer (Zentrifugation: 1500 rpm, 8 min, 20 °C) folgte die Markierung der extrazellulären Epitope durch Inkubation mit entsprechenden Fluorochrom-markierten Antikörpern für 30 Minuten bei 4 °C. Ein abschließender Waschschriff aller Proben mit FACS-Puffer diente dem Entfernen überschüssiger Antikörper vor der Messung (Zentrifugation: 1600 rpm, 8 min, 10 °C).

In den Messungen, in denen Sekundärantikörper verwendet wurden (Ziege anti-Ratte IgG), entfiel die Vitalfärbung mit Zombie Yellow und der F_c-Block. Es wurden 0,5 µl Sekundärantikörper pro FACS-Röhrchen verwendet und für 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die weitere Färbung der extrazellulären Epitope erfolgte nach zwei Waschschriffen mit FACS-Puffer (Zentrifugation: 1600 rpm, 8 min, 10 °C).

Als Kontrollen dienten „Fluorescence Minus One“- oder FMO-Messungen. Hierfür wurde zu jeder gemessenen Fluorochromkombination ein korrespondierendes Kontrollröhrchen mitgemessen, das alle Fluorochrome bis auf eines enthielt. Alle verwendeten Konzentrationen orientierten sich an den Herstellerangaben. Die Proben wurden am FACS-Calibur-Durchflusszytometer oder am LSRII-Durchflusszytometer gemessen und mit der FACSDiva-Software (BD Biosciences) oder der FlowJo-Software (FlowJo, LLC, Ashland, Oregon, USA) analysiert.

3.2.3.3 Phänotypische Differenzierung verschiedener Zellpopulationen

Tab. 12: Markerprofile der untersuchten MDSC und T-Zellen.

| <u>Zellart</u> | <u>Markerprofil</u> | <u>Referenz</u> |
|-----------------|---|-----------------|
| MDSC | PMN-MDSC: CD45 ⁺ CD11c ⁻ CD11b ⁺ Ly6G ⁺ Ly6C ⁺ MHCII ⁻ | [63, 65] |
| | M-MDSC: CD45 ⁺ CD11c ⁻ CD11b ⁺ Ly6G ⁻ Ly6C ^{high} MHCII ⁻ | |
| | Gesamt: CD45 ⁺ Gr-1 ⁺ CD11b ⁺ | |
| T-Zellen | Zytotoxische T-Zellen: CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ | [177, 178] |
| | Zentrale-Gedächtniszellen: CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD44 ^{high} CD62L ⁺ | |
| | Effektor-Gedächtniszellen: CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD44 ^{high} CD62L ⁻ | |

Abbildung 7 zeigt die Gatingstrategie für MDSC und T-Zellen nach in Tabelle 12 genannten Oberflächenmarkern.

1. **Ausschluss von Zelldebris:** Im ersten Schritt wurden alle gemessenen Zellen nach den relativen Einheiten des abgelenkten Lichtes gegen das Maß für Streulicht im FSC-SSC-Plot gegeneinander aufgetragen. Die außerhalb der ersten Region gelegenen Zellen wurden als Zelldebris definiert und ausgeschlossen.
2. **Selektion lebender Zellen:** Zombie Yellow ist ein Amin-reaktiver fluoreszierender Stoff, der nur bei Zellen mit beschädigter Zellmembran nach Intrazellulär gelangen kann. Es wird durch den violetten Laser des LSRII-Durchflusszytometers (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) zur Fluoreszenz angeregt und emittiert maximal im 572 nm Bereich. [179] Zombie Yellow positive Zellen wurden demnach als abgestorbene Zellen definiert und die für den Farbstoff negativen Zellen markiert und weiter ausgewertet.

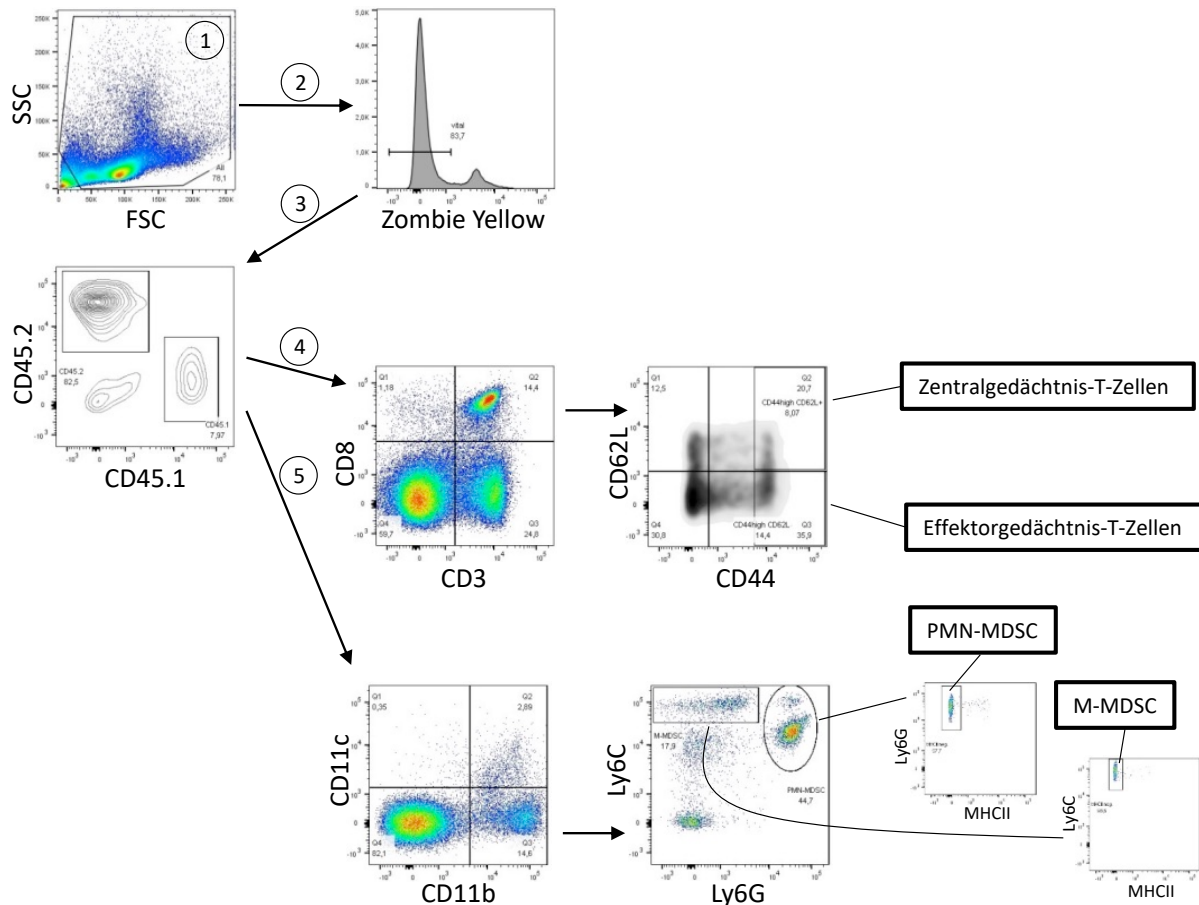


Abb. 7: Gatingstrategie für T-Zellen und MDSC. Auswertung im Beispiel mittels FlowJo-Software.

3. **Unterscheidung rekonstituierter von mauseigenen Zellen:** Vitale Zellen wurden nach den Panleukozytenmarkern CD45.1 (rekonstituierte Leukozyten) und CD45.2 (mauseigene Leukozyten) aufgetrennt. Beide Zellpopulationen wurden daraufhin identisch, wie in den folgenden Schritten beschrieben, ausgewertet. In Abbildung 7 ist exemplarisch die Auswertung für die CD45.2⁺- Zellen dargestellt.
4. **Differenzierung der T-Zellen:** Auftrennung nach den T-Zell-Markern CD3 und CD8. Die Zellen aus dem rechten oberen Quadranten entsprechen CD3⁺ CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen und wurden im nachfolgenden Schritt nach ihrer CD44- und CD62L-Expression aufgetrennt. In der für CD44 stark positiven Zellfraktion (im Folgenden CD44^{high} genannt) wurden weitere zwei T-Zell-Populationen unterschieden. *Central memory T-cells*, im Folgenden als Zentralgedächtniszellen bezeichnet, wurden als CD44^{high} CD62L⁺ definiert. *Effector memory T-cells*, weiterhin Effektorgedächtniszellen genannt, wurden als CD44^{high} CD62L⁻ definiert.
5. **Differenzierung von MDSC:** Myeloide Suppressorzellen sind CD11c⁻ und CD11b⁺. Somit wurde im CD11c-CD11b-Plot der rechte untere Quadrant weiter untersucht. Polymorphonukleäre- (PMN-) MDSC sind Ly6G⁺ Ly6C⁺. Monozytäre- (M-) MDSC

sind Ly6G⁻ und stark positiv für Ly6C (Ly6C^{high}). Beide MDSC-Subpopulationen wurden als MHC-II-negativ definiert. Der Ausschluss MHCII⁺ Zellen wurde für die in den Ergebnissen gezeigten Daten dem Ly6G-Ly6C-Plot vorgezogen, sodass in den Ly6G-Ly6C-Plots ausschließlich CD11c⁻ CD11b⁺ MHCII⁻ - Zellen dargestellt wurden.

3.2.3.4 Tod / Lebend-Bestimmung mittels Annexin-V und 7-AAD-Doppelmarkierung

Die verwendete Methode der Vitalitätsbestimmung basiert auf der Anfärbung apoptotischer Zellen mit Fluorochrom-markiertem Annexin V. [180] Annexin V ist ein Protein aus der Gruppe der Phospholipid-bindenden Annexine, welches Ca²⁺-abhängig und mit hoher Affinität das negativ geladene Phosphatidylserin der äußeren Plasmamembran bindet. Konstitutiv auf der Zelloberfläche lokalisierte Phospholipide wie Phosphatidylcholin oder Sphingomyelin werden kaum gebunden. [180, 181] Die Exposition von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche geschieht bereits in einer frühen Phase der Apoptose. [181, 182] Andererseits würde eine Bindung auch nach Membranruptur, also in der späten Apoptose mit Übergang in die sekundäre Nekrose stattfinden. [181] Um eine genauere Betrachtung der Vitalität zu schaffen und eine sichere Zuordnung der Zellen in die Kategorien a) lebende, b) früh-apoptotische und c) spät-apoptotische bzw. nekrotische Zellen zu ermöglichen, wurde das Färbeprotokoll noch um den Vitalitätsfarbstoff 7-AAD (7-Aminoactinomycin D) erweitert. 7-AAD ist ein fluoreszierendes Derivat von Actinomycin D. Dringt es, bedingt durch nicht intakte Zellmembranverhältnisse ins Zellinnere ein, bindet es dort an GC-Regionen der DNA. [183] Es lässt sich dann im FL3-Kanal des Durchflusszytometers messen.

Es können insgesamt vier verschiedene Vitalitäts-Phasen unterschieden werden, wovon die ersten drei weiter betrachtet wurden:

- | | | |
|--------------------------|---|---|
| a) Annexin V - / 7-AAD - | → | vitale Zellen |
| b) Annexin V+ / 7-AAD- | → | früh-apoptotische Zellen |
| c) Annexin V+ / 7-AAD+ | → | spät-apoptotische / sekundär nekrotische Zellen |
| d) Annexin V- / 7-AAD+ | → | ehemals vitale Zellen, die durch Schädigung primär nekrotisch geworden sind |
- [181, 183, 184]

2,0 x 10⁵ Milzzellen oder 100 – 200 µl Blut wurden nach Lyse der Erythrozyten einmal in Annexin V Binding-Puffer (1-fach konzentriert) gewaschen. Nach dem Abzentrifugieren und Lösen des Zellpellets wurden je 0,5 µl Annexin V und 1,25 µl 7-AAD in 100 µl Annexin V Binding-Puffer zu den Zellen gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit jeweils 1 ml Binding-Puffer pro Probe

erfolgte die umgehende Messung in 300 µl Binding-Puffer am FACS-Calibur Durchflusszytometer (alle Zentrifugationsschritte: 400 x g, 5 min, 20 °C).

Zur Überprüfung der Methode erfolgten Kontrollmessungen mit Milzzellen mit oder ohne vorhergehende Lymphodepletion, oder nach Apoptoseinduktion durch Inkubation der Zellen mit 200 µM H₂O₂ für 4 Stunden bei Raumtemperatur.

3.2.3.5 Bestimmung der tumorspezifischen IFN-γ Freisetzung

a) Cytokine Release Assay (CRA)

Um die IFN-γ Produktion tumorspezifischer T-Zellen aus Tumorstimulierten-drainierenden Lymphknoten (TVDLN) zu bestimmen, wurden die Lymphknotenzellen am Tag 12 nach Tumorstimulation (Tag 9 nach Lymphodepletion) isoliert. 4,0 x 10⁶ Zellen wurden für zwei Tage mit 5 µg/ml anti-CD3 (Klon 2C11) polyklonal stimuliert und anschließend vier Tage mit 60 IU/ml IL-2 in Gentamicin-haltigem Medium expandiert. Im Anschluss wurden die aktivierten TVDLN zusammen mit D5-Tumorzellen oder Zellen der Kontrollzelllinien MCA310, LLC1 oder mGC8 in Gentamicin- und IL-2-haltigem (10 IU/ml) Medium in Multiwell – Zellproliferationsplatten inkubiert. Die Tumorzellen wurden zuvor kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase trypsinisiert. Das für die Koinkubation verwendete Medium richtete sich nach der Tumorzellart und die Tumorzellzahl nach der jeweiligen Zellausbeute der TVDLN nach Expansion und Stimulation. Es wurden entweder 4,0 x 10⁶ TVDLN mit 0,8 x 10⁶ Tumorzellen in einer 24-well Platte zusammengegeben, oder bei geringerer Ausbeute 1,0 x 10⁶ TVDLN mit 0,2 x 10⁶ Tumorzellen in einer 48-well Platte koinkubiert. Nach 18 Stunden wurden die Überstände abgenommen und in Eppendorf-Mikrozentrifugenröhrchen bei -40 °C für spätere IFN-γ- Zytokinbestimmungen mittels ELISA eingefroren.

b) Enzyme-linked-immunosorbent Assay (ELISA)

Der *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA, schematische Darstellung in Abb. 8) dient der quantitativen Bestimmung eines Antigens durch Verwendung eines Enzyms als Marker. Die Konzentration des nachzuweisenden Moleküls wird mittels Standardkurve über den Substratumsatz bestimmt. Im Rahmen dieser Arbeit stellte IFN- γ das Antigen dar. Im Folgenden wird die Methode daher am Beispiel des IFN- γ ELISA beschrieben.

Im ersten Schritt wurde eine Mikrotiter-Platte (96-wells) über Nacht mit Anti-Maus IFN-γ Antikörpern (1 µg/ml) in 0,1 molarem Karbonat-Puffer (*Coating* - Puffer) inkubiert. In diesem als *Coating* bezeichneten Schritt kommt es durch die hohe Bindungskapazität der Polysterol-Platte für Proteine zu einer Adsorption der Antikörper (*Capture* - Antikörper) an die Platte. Nach dem *Coating* wurden überschüssige freie Proteinbindungsstellen durch Blockierungs-

Puffer, bestehend aus in PBS (1x) gelöstem BSA (2 %), abgeblockt. So verhindert man die unspezifische Bindung später hinzugegebener Enzym-markierter Antikörper und eine damit verbundene Hintergrundaktivität. Nach dem Blockierungsschritt wurden die Proben und eine Standardreihe pipettiert. Alle Waschschritte erfolgten mit 0,05 % Tween-20 in PBS (1x). Das sorgfältige Waschen zwischen den Inkubationsschritten verhindert ebenfalls Hintergrundaktivität, unter anderem durch das Entfernen ungebundener Antikörper. Zur Detektion verwendeten wir gegen murines IFN- γ gerichtete und biotinylierte Antikörper (1 $\mu\text{g/ml}$) in Kombination mit Streptavidin-HRP (1:1000 verdünnt; HRP = Horse Radish Peroxidase). Als Substrat für die Peroxidase diente 3,3', 5,5' - Tetramethylbenzidin (TMB). Der Substratumsatz ist in dieser Kombination als blaue Verfärbung zu erkennen. Umso intensiver der Farbton, desto mehr Substrat wurde umgesetzt, bzw. mehr IFN- γ im Well nachgewiesen. Die Reaktion wurde mit 1-molarer Schwefelsäure (1M H_2SO_4) abgestoppt. Abschließend erfolgte die kalorimetrische Bestimmung der IFN- γ -Konzentration der einzelnen Proben aus dem CRA im ELISA-Reader. [185]

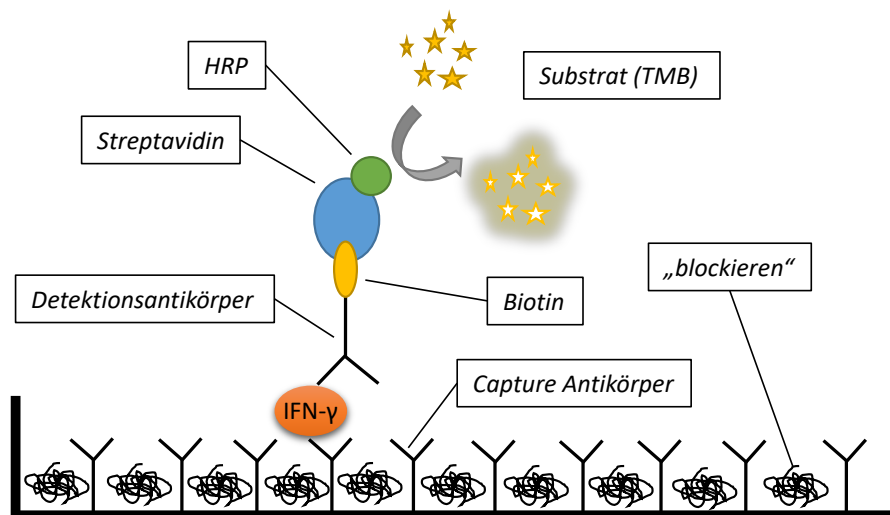


Abb. 8: Schematische Darstellung eines Enzyme-linked-immunosorbent Assay.

3.2.4 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA 92037 USA). Als statistische Methoden wurden der ungepaarte Student's t-Test und die zweifaktorielle ANOVA herangezogen. Die verwendete statistische Methode ist jeweils unterhalb der einzelnen Abbildungen angegeben. Die Ergebnisse wurden, wenn nicht anders angegeben, als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde in den Abbildungen durch ein (p-Werte < 0,05), zwei (p-Werte < 0,01) oder drei Sternchen (p-Werte < 0,001) wiedergegeben. Nicht-signifikante Ergebnisse wurden mit „ns“ beschriftet, oder unbeschriftet belassen.

4. Ergebnisse

Wir untersuchten zunächst die Auswirkung von LRAST auf die zur Rekonstitution einen Tag nach Lymphodepletion intravenös (i.v.) in die Schwanzvene der CD45.2⁺ Empfängerermäuse verabreichten CD45.1⁺ Milzzellen. Insbesondere der Effekt der alkylierenden Substanz Cyclophosphamid auf die naiven Spenderzellen und ihre langfristige Entwicklung im CD45.2⁺ Empfänger sollten aufgeklärt werden.

4.1 Überprüfung der Vitalität rekonstituierter CD45.1⁺ Zellen nach dem i.v.-Transfer

C57BL/6 – Mäuse (CD45.2⁺) wurden mit oder ohne Cyclophosphamid behandelt und 24 Stunden später mit 20×10^6 CD45.1⁺ Milzzellen i.v. rekonstituiert. Um auszuschließen, dass das Zytostatikum 24 Stunden nach Verabreichung noch einen negativen Einfluss auf die Spenderzellen hat, untersuchten wir die CD45.2⁺- und CD45.1⁺- Zellen aus dem Blut und der Milz behandelter Mäuse. Durch die Doppelmarkierung mit Annexin V und 7-AAD und die anschließende durchflusszytometrische Analyse am FACS-Calibur wurde die Vitalität der Zellen basierend auf der Methode von Vermes *et al.* untersucht. [180]

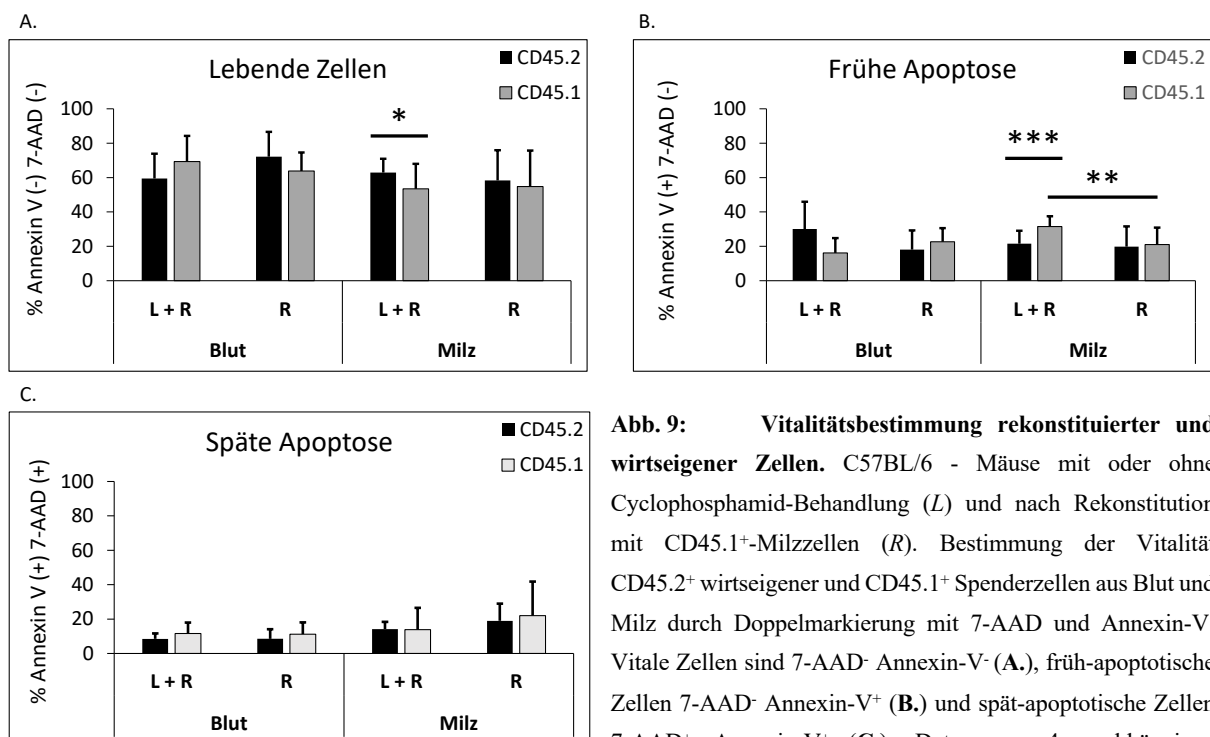


Abb. 9: Vitalitätsbestimmung rekonstituierter und wirtseigener Zellen. C57BL/6 - Mäuse mit oder ohne Cyclophosphamid-Behandlung (L) und nach Rekonstitution mit CD45.1⁺-Milzzellen (R). Bestimmung der Vitalität CD45.2⁺ wirtseigener und CD45.1⁺ Spenderzellen aus Blut und Milz durch Doppelmarkierung mit 7-AAD und Annexin-V. Vitale Zellen sind 7-AAD⁻ Annexin-V⁻ (A.), früh-apoptotische Zellen 7-AAD⁻ Annexin-V⁺ (B.) und spät-apoptotische Zellen 7-AAD⁺ Annexin-V⁺ (C.). Daten aus 4 unabhängigen

Versuchen, inklusive Mehrfachbestimmungen ($n = 16$ für die Milzmessungen und $n = 14$ für die Blutmessungen). Balken stellen Mittelwerte \pm SD dar. Statistische Signifikanz wurde mittels Student's t-Test ermittelt.

Innerhalb der Zellpools von CD45.1⁺ Spender- und CD45.2⁺ Empfängerleukozyten zeigte sich ein signifikanter Einfluss der vorhergehenden Lymphodepletion mit CTX nur im Bereich der

CD45.1⁺ Zellen in der Milz (Abb. 9, B). Nach CTX-Anwendung wiesen 31,7 % der Leukozyten Zeichen einer frühen Apoptose auf, im Gegensatz zu 20,9 % ohne vorhergehende Lymphodepletion. Dieser Unterschied fand sich nicht im Blut und spiegelte sich auch nicht im Anteil spätapoptotischer oder vitaler Zellen in der Milz oder im Blut wieder.

Beim Vergleichen der CD45.1⁺ Spender- mit den CD45.2⁺ Empfängerleukozyten fanden wir signifikant mehr frühapoptotische (Abb. 9, B; 21,4 % vs. 31,7 %; $p < 0,001$) und signifikant weniger vitale (Abb. 9, A; 62,8 % vs. 53,7 %; $p = 0,04$) Spenderzellen in der Milz bei Versuchstieren, die zuvor CTX erhalten hatten. Ein entsprechender Unterschied zeigte sich bei Betrachtung des späten Apoptosezustands in der Milz nicht (Abb. 9, C). Spender- und Empfängerleukozyten boten im Blut auch trotz CTX-Anwendung keinen signifikanten prozentualen Unterschied vitaler, früh- oder spätapoptotischer Zellen (Abb. 9, A, B, C). Ebenso wiesen CD45.1⁺ und CD45.2⁺ Leukozyten aus Versuchstieren, die kein CTX erhalten hatten im Blut und in der Milz prozentual vergleichbare Werte auf (Abb. 9, A, B, C).

4.2 Entwicklung des Rekonstitutionsproduktes in der Empfängermaus

Der prozentuale Anteil der rekonstituierten Zellen im Verhältnis zu den Empfängerzellen wurde als Parameter des Rekonstitutionserfolgs bestimmt.

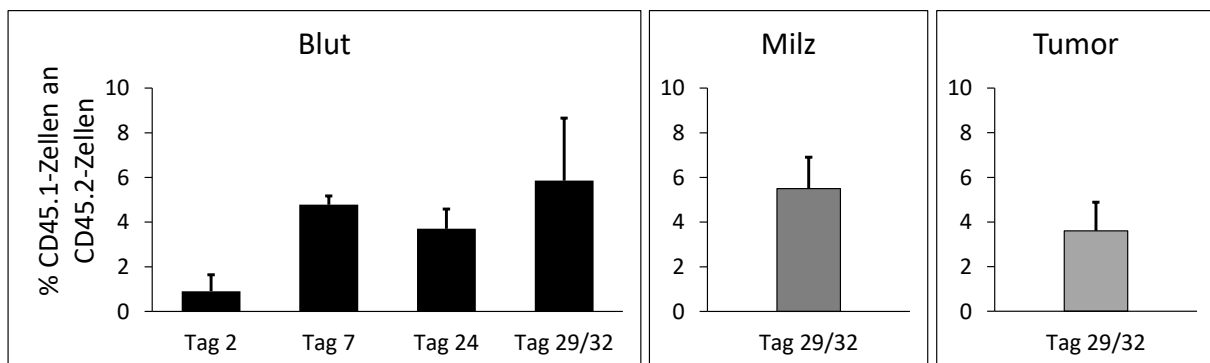


Abb. 10: Verhältnis CD45.1⁺- zu CD45.2⁺-Zellen. Werte aus C57BL/6 -Mäusen mit etablierten D5-Tumoren nach Cyclophosphamid-Behandlung (L) und Rekonstitution mit CD45.1⁺-Milzzellen (R), mit oder ohne aktiv-spezifische Tumorzellvakzinierung (AST). Die Balkendiagramme zeigen den Anteil der CD45.1⁺- an CD45.2⁺- Zellen in Prozent, zu unterschiedlichen Messzeitpunkten aus Blut, Milz und Tumor. Die Möglichkeit der Mehrfachabnahme von Blut lässt eine Verlaufsbeurteilung der Blutleukozyten zu. Die Werte aus der Milz und dem Tumor wurden zu jeweils einem Zeitpunkt pro Maus am Ende des Versuches ermittelt. Die Daten stammen aus 5 unabhängigen Versuchen, inklusive Mehrfachmessungen ($n = 3-5$ pro Versuchszeitpunkt). Werte aus Mäusen von Tag 29 und Tag 32 werden zusammengefasst und als ein Messzeitpunkt betrachtet. Balken stellen Mittelwerte \pm SD dar.

CD45.1⁺-Zellen waren im Blut, in der Milz und im Tumor bis zu 32 Tage nach Lymphodepletion noch nachweisbar (Abb. 10). Im Blut zeigte sich am Tag 2, also einen Tag nach Rekonstitution, nur ein geringer Anteil CD45.1⁺ Zellen an den CD45.2⁺-Empfängerzellen (ca. 1 %). An den darauffolgenden Messzeitpunkten am Tag 7, 24 und 29/32 wurde ein höherer

Anteil von CD45.1⁺ Zellen des Rekonstitutionsproduktes an den CD45.2⁺ Zellen bestimmt (5 ± 1 %). Auch in der Milz und im Tumor fanden sich einen Monat nach Rekonstitution (Tag 29/32) CD45.1⁺ Zellen, die mit 5 % (Milz) und 4 % (Tumor) zum Blut vergleichbare Werte aufwiesen.

4.3 Einfluss von LRAST auf MDSC

Um zu ermitteln welchen Einfluss LRAST auf die Frequenz von MDSC hat, wurde eine durchflusszytometrische Analyse der Leukozyten aus dem peripheren Blut, der Milz und dem Tumor zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt.

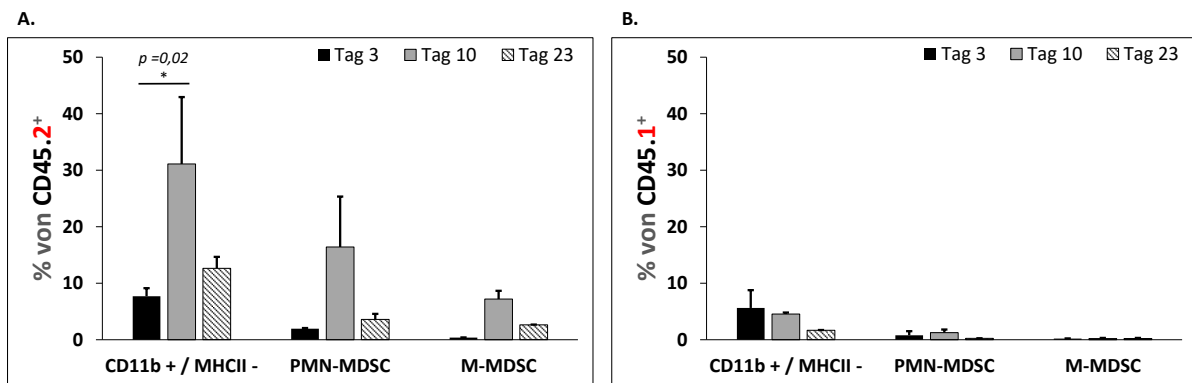
Zu Beginn der Verlaufsbeobachtung myeloider Zellen im Blut und in der Milz der Versuchstiere fanden sich in der Milz (Tag 3, Abb. 11) 7,7 % CD45.2⁺ CD11b⁺ MHCII⁻ myeloide Zellen, 2,0 % PMN-MDSC und 0,4 % M-MDSC, sowie 5,6 % CD45.1⁺ CD11b⁺ MHCII⁻ myeloide Zellen, 0,8 % PMN-MDSC und 0,2 % M-MDSC. Im Blut (Tag 0, Abb. 11) fanden sich 14,2 % CD45.2⁺ CD11b⁺ MHCII⁻ myeloide Zellen, 4,7 % PMN-MDSC und 1,6 % M-MDSC (Tag 0), sowie (Tag 7) 8,5 % CD45.1⁺ CD11b⁺ MHCII⁻ myeloide Zellen, 1,1 % PMN-MDSC und 0,1 % M-MDSC.

Wir stellten im Blut und in der Milz eine signifikante Zunahme der CD45.2⁺ CD11b⁺ MHCII⁻ myeloiden Zellen ungefähr eine Woche nach LRAST fest (Abb. 11, A und C). Dies spiegelte sich auch in den Tochterpopulationen, den PMN- und M-MDSC in beiden Organen wieder. Zum zweiten Messzeitpunkt am Tag 7 (Blut), bzw. Tag 10 (Milz) nach Lymphodepletion der Versuchstiere wurden die maximalen Werte, gemessen als prozentualer Anteil an den CD45.2⁺ Gesamtleukozyten, erreicht. Im Blut beispielsweise, stellte sich ein signifikanter Anstieg der CD45.2⁺ PMN-MDSC von 4,7 % am Tag 0 auf 51,1 % am Tag 7 dar ($p < 0,001$). In der gleichen Zeit nahmen die CD45.2⁺ M-MDSC von 1,6 % auf 6,6 % deutlich zu ($p = 0,8$). Zum Versuchsende (Tag 23 für die Milz- und Tag 24 für die Blutmessungen) gingen die Werte wieder deutlich zurück. Für PMN- und M-MDSC aus Blut und Milz, sowie für CD11b⁺ MHCII⁻ Zellen aus der Milz, lagen die Zellfrequenzen nach ca. einem Monat über den Ausgangswerten ohne das Signifikanzniveau zu erreichen. Nur die Frequenz der CD11b⁺ MHCII⁻ Zellen aus dem peripheren Blut nahmen von Tag 0 bis Tag 24 signifikant zu ($p = 0,008$).

Im Vergleich zu den CD45.2⁺ myeloiden Zellen fanden sich im Blut und in der Milz zu jedem Messzeitpunkt prozentual deutlich weniger myeloide Zellen aus dem Rekonstitutionsprodukt (CD45.1⁺ CD11b⁺ MHC-II⁻ Zellen) (Abb. 11: A, B, C und D). Die Frequenz der CD45.1⁺ CD11b⁺ MHC-II⁻ Zellen nahm nach der Immunrekonstitution im Blut und in der Milz der Empfängermäusen vom ersten bis zum letzten Messzeitpunkt ab (Abb. 11, B und D). Weder in

der Milz noch im Blut zeigte sich, wie bei CD45.2⁺ Empfängerzellen beobachtet, ein Anstieg der CD45.1⁺ CD11b⁺ MHCII⁻ Zellen, oder einer der Subpopulationen, der mit der Rekonstitution übertragenen CD45.1⁺ MDSC. (Abb. 11, B und D).

Milz



Blut

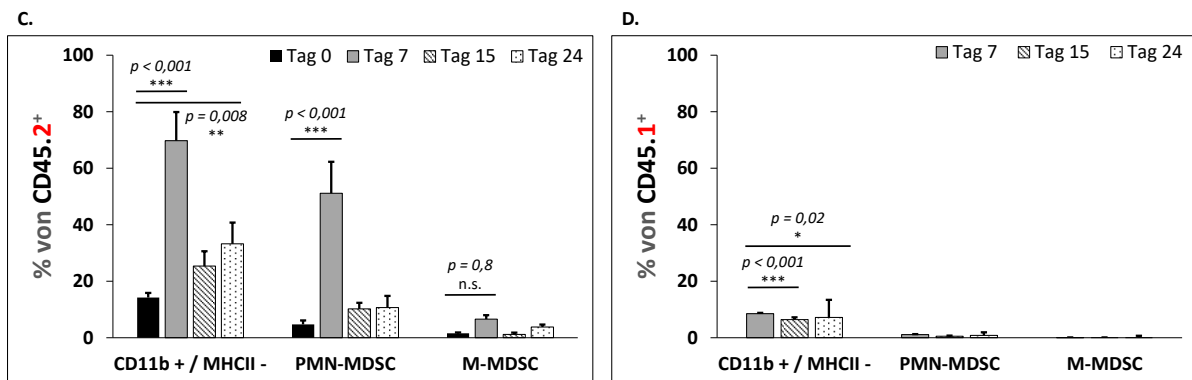


Abb. 11: Myeloide Zellen aus Milz und Blut nach LRAST-Behandlung. C57BL/6 Mäuse erhielten 5×10^4 D5-Zellen durch s.c. Injektion und wurden nach LRAST-Schema mit Cyclophosphamid (L) und aktiv-spezifischer Vakzinierung (AST) behandelt. Die MDSC-Grundpopulation (CD11b⁺ MHC-II⁻), sowie PMN-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C⁺) und M-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C^{high}) aus **A.** + **B.** Milz ($n = 2$) und **C.** + **D.** Blut ($n = 3$) wurden an den Tagen 3, 10 und 23 (Milz) und 0, 7, 15 und 24 (Blut) bestimmt. Angaben jeweils in Prozent von Gesamtleukozyten, differenziert nach Empfängerzellen (CD45.2⁺, **A** und **C**) und rekonstituierten Leukozyten (CD45.1⁺, **B** und **D**). Balken stellen Mittelwerte \pm SD dar. Statistische Signifikanzen wurden mittels zweifaktorieller ANOVA ermittelt.

Der prozentuale Anteil der CD45.2⁺ CD11b⁺ MHC-II⁻ - Zellen im Tumor lag bei ca. 17 % (Abb. 12). Der Anteil transferierter tumorinfiltrierender CD45.1⁺ CD11b⁺ MHC-II⁻ - Zellen lag deutlich niedriger bei 4,3 % (Abb. 12). Die tumorinfiltrierenden CD45.2⁺ PMN-MDSC lagen bei 2,3 % und die CD45.2⁺ M-MDSC bei 4,8 % (Abb. 12, $p = 0,017$). Entsprechend den Messungen in Milz und Blut war auch im Tumor die Infiltration von PMN- und M-MDSC aus dem durch Rekonstitution übertragenen Zellpool gering (CD45.1⁺ PMN-MDSC: 0,08 % und CD45.1⁺ M-MDSC: 0,23 %, siehe Abb. 12).

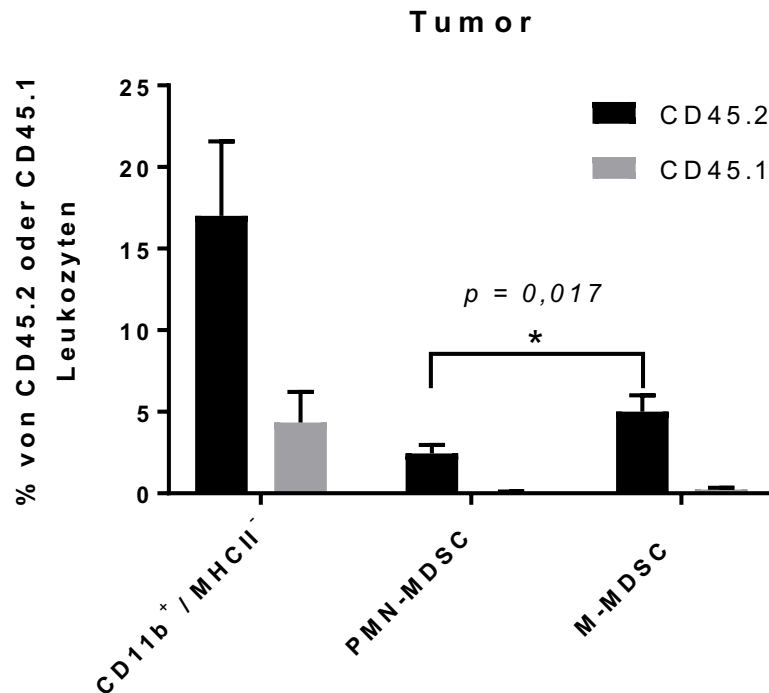


Abb. 12: Myeloide Zellen aus dem D5-Melanom am Tag 29/32 nach LRAST-Behandlung. C57BL/6 Mäuse erhielten 5×10^4 D5-Zellen durch s.c. Injektion und wurden nach LRAST-Schema mit Cyclophosphamid (L) und aktiv-spezifischer Vakzinierung (AST) behandelt. Die Mäuse wurden am Tag 29 oder 32 getötet, die Messwerte von beiden Tagen zusammengefasst und als ein Messzeitpunkt betrachtet (insg. $n = 3$). Die Balken geben den Anteil der MDSC-Grundpopulation (CD11b⁺ MHC-II⁺), sowie der PMN-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C⁺) und M-MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C^{high}) an den Leukozyten im Tumor wieder. Angaben jeweils in Prozent von Gesamtleukozyten, differenziert nach Empfängerzellen (CD45.2⁺) oder rekonstituierten Leukozyten (CD45.1⁺). Balken stellen Mittelwerte \pm SD dar. Statistische Signifikanz wurde mittels Student's t-Test ermittelt.

4.4 LRAST mit Depletion myeloider Suppressorzellen

Um zu untersuchen, ob durch die Anwendung eines anti-Gr-1 Depletionsantikörpers (Klon RB6-8C5) die in Blut und Milz von CD45.2⁺ Empfängermäusen am Tag 7 bzw. Tag 10 nach Lymphodepletion beobachtete Zunahme der CD45.2⁺ MDSC (Abb. 11: A und C) abgefangen werden kann, wurde das LRAST-Behandlungsschema, wie in Abb. 3 (3.2.2.1, Material und Methoden) dargestellt erweitert. Da MDSC in tumortragenden Versuchstieren immunsuppressiv und tumorfördernd wirken [50], wurde zudem eruiert, ob eine MDSC-Depletion die Effektivität tumorspezifischer T-Zellen verbessern kann. Zur Depletion der MDSC wurden nur anti-Gr-1 mAk einer Klonalität appliziert. Daher werden im Folgenden die Begriffe anti-Gr-1 mAk und RB6-8C5 analog verwendet.

Die Versuchstiere mit etablierten D5-Tumoren erhielten zusätzlich zu LRAST repetitive i.p. Injektionen des anti-Gr-1 mAk. Durch wiederholte Blutentnahmen wurde der Depletionsstatus der PMN- und M-MDSC kontrolliert. Dabei galt es zu beachten, dass es bei Verwendung der

Kombination aus fluorochrommarkierten anti-Ly6G mAk und anti-Ly6C mAk zur MDSC-Differenzierung zu verfälschten Ergebnissen kommt, da anti-Ly6G mAk aufgrund der Depletionsantikörperbindung nicht an ihr Zielepitop binden können. Das Problem wurde umgangen indem die Bindung von RB6-8C5 (Isotyp: Ratte IgG2b κ) an die Zielzellen durch einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (Ziege *anti-Ratte* IgG; in den Abbildungen 13, 14 und 15 als Sek. Ak⁺ bezeichnet) gegen das Ratten-IgG dargestellt wurde. Da fluorochrommarkierte anti-Ly6C mAk trotz Vorhandensein der anti-Gr-1 mAk ungehindert binden, konnte durch die Antikörperkombination aus anti-CD11b mAk und anti-Ly6C mAk die Gesamtfraction der MDSC quantifiziert werden. Durch die Kombination aus fluorochrommarkierten anti-Ly6C mAk, anti-Ly6G mAk und Sekundärantikörpern konnten aber auch beide MDSC-Populationen erfasst und der Anteil der mit anti-Gr-1 mAk maskierten Zellen quantifiziert werden. Die zum Vergleich dargestellte Kontrollgruppe erhielt keine LRAST-Behandlung, aber zeitlich und mengenmäßig äquivalente i.p.-Injektionen eines Isotyps (anti-Phytochrom Antikörper = anti-Phyt).

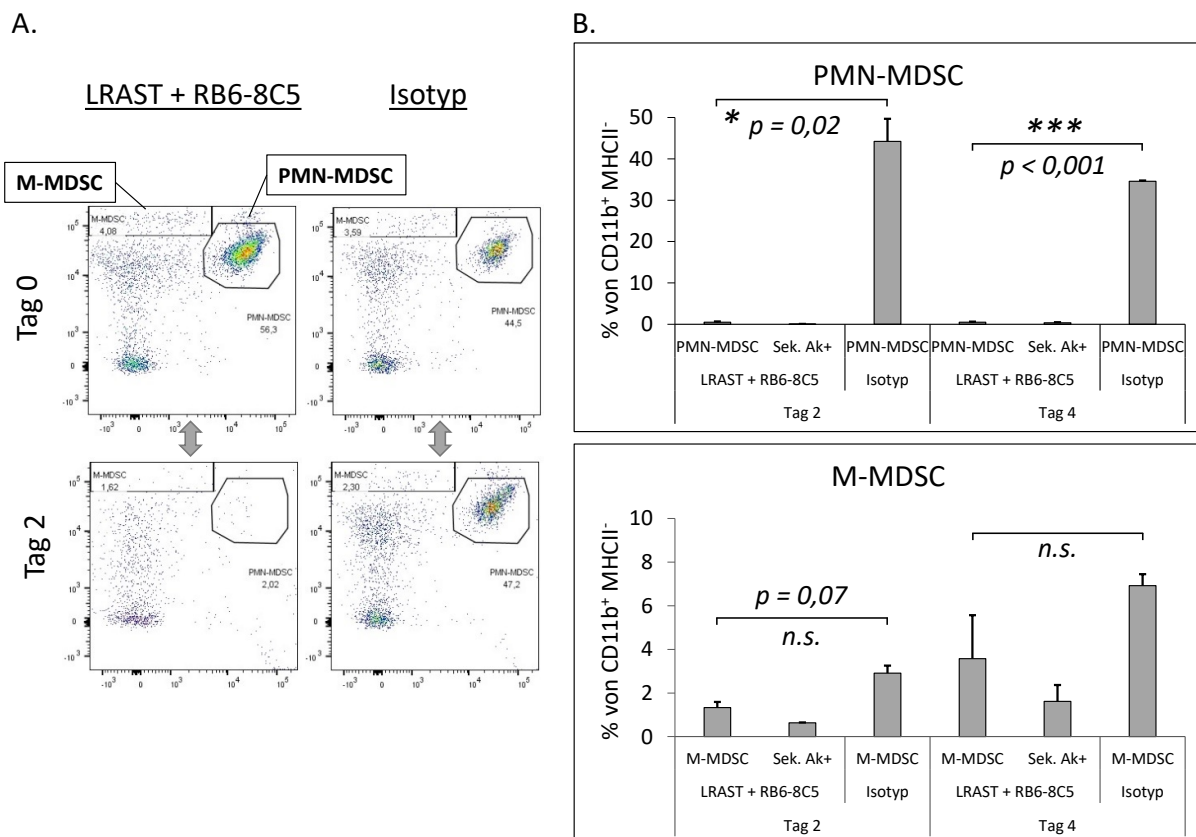


Abb. 13: Depletion von PMN- und M-MDSC an Tag 2 und Tag 4. C57BL/6 Mäuse erhielten $4 \times 5 \times 10^4$ D5-Zellen durch s.c. Injektion und wurden nach LRAST-Schema in Kombination mit einer MDSC-Depletion behandelt: Cyclophosphamid (L) + aktiv-spezifische Vakzinierung (AST) + anti-Gr-1 mAk (RB6-8C5). Die Kontrollgruppe mit D5-Tumortragenden Mäusen erhielt nur Isotyp-Antikörper analog zur MDSC-Depletion. RB6-8C5 (230 μ g) und eine äquivalente Menge Isotyp-Antikörper wurden alle 48 Stunden, beginnend drei Tage nach Tumorgabe injiziert (jeweils $n = 2$). **A.** Pseudocolor-Plots mit MDSC-Subpopulationen der Gruppen LRAST + MDSC-Depletion vs. Kontrolle (D5-Tumortragende Mäuse ohne Behandlung) am

Tag 0 und 48 Stunden nach erster RB6-8C5-Anwendung. **B.** Darstellung des Depletionserfolgs an den Tagen 2 und 4 für PMN- und M-MDSC jeweils in Prozent von $CD45^+ CD11b^+ MHCII^-$ Zellen. Die Messungen erfolgten jeweils aus peripherem Blut und 48 Stunden nach letzter RB6-8C5-Anwendung. Zusätzlich sind RB6-8C5-gebundene und durch Sekundärantikörper (Ziege anti-Ratte IgG) markierte Zellen angegeben (Sek. Ak+). Statistische Signifikanz wurde mittels Student's t-Test ermittelt.

48 Stunden nach der ersten Anwendung des MDSC-Depletionsantikörpers reduzierte sich die Zellzahl der MDSC, sowohl im PMN-, wie auch im M-MDSC-Gate, bei Mäusen, die mit LRAST und RB6-8C5 behandelt wurden. (Abb. 13, A). Im Vergleich zur Kontrollgruppe ließ sich für PMN-MDSC am Tag 2 und Tag 4, also nach der ersten und zweiten Anwendung des Depletionsantikörpers, eine jeweils signifikante Reduktion der Zellzahl feststellen (Abb. 13, B oben). Zu beiden Messzeitpunkten konnten keine RB6-8C5-beladenen PMN-MDSC mit dem Sekundärantikörper nachgewiesen werden. Die Frequenz der M-MDSC war weder am Tag 2, noch am Tag 4, durch die Anwendung der anti-Gr-1 mAk signifikant vermindert. Jedoch war am Tag 2 der prozentuale Anteil der M-MDSC in der Gruppe LRAST + RB6-8C5 mit 1,3 % im Vergleich zu 2,9 % in der Kontrollgruppe deutlich reduziert (Abb. 13, B unten). Nach erster und zweiter Verabreichung des Depletionsantikörpers waren Sekundärantikörper-beladene M-MDSC (Tag 2: 0,6 %, Tag 4: 1,6 %) im peripheren Blut der Versuchstiere messbar.

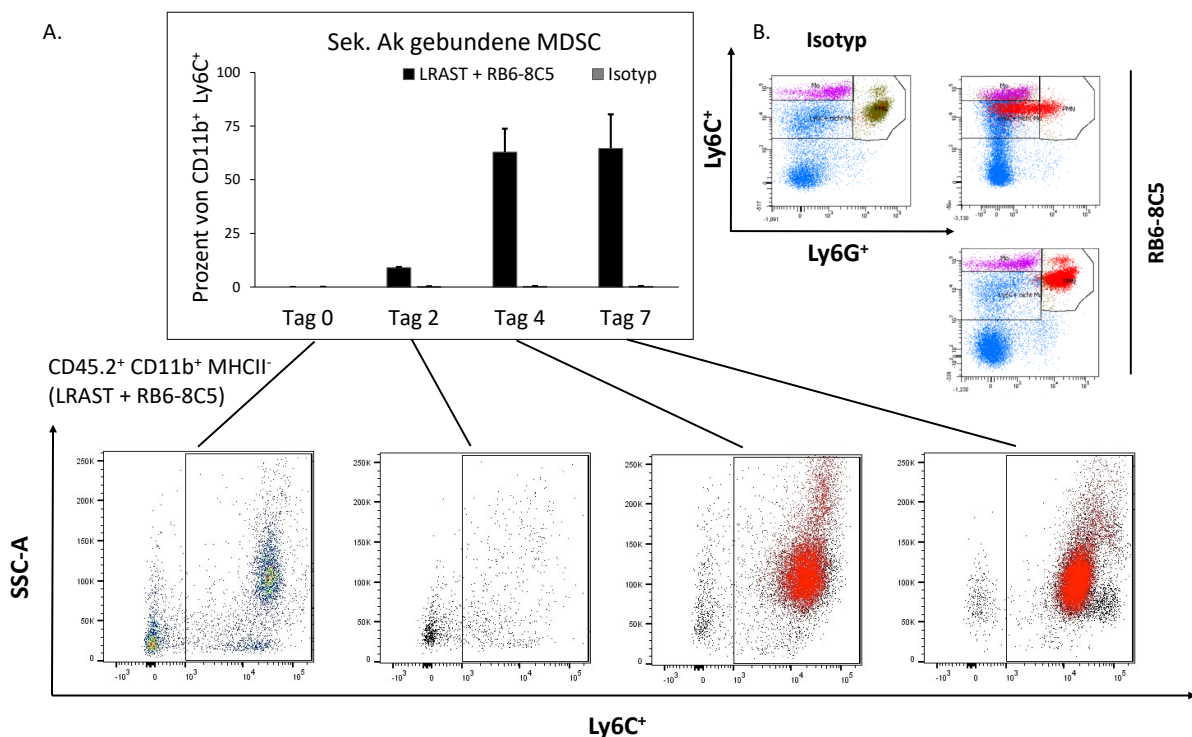


Abb. 14: Sekundärantikörperbindung der MDSC bis Tag 7. A. Darstellung von durch den Sekundärantikörper anfärbarer Zellen in Prozent von $CD45.2^+ CD11b^+ MHCII^- Ly6C^+$ Zellen an den Tagen 0, 2, 4 und 7 nach Lymphodepletion (oben), als Mittelwertbalken mit SD. Für den Sekundärantikörper positive Zellen sind in den Pseudocolour-Plots (SSC / Ly6C, unterer Bildabschnitt) für den jeweiligen Tag der Messung in Rot markiert. B. Repräsentative Ly6G - Ly6C - Plots von Messungen am

Tag 7 mit Darstellung von PMN-MDSC ($\text{Ly6G}^+ \text{Ly6C}^+$) und M-MDSC ($\text{Ly6G}^- \text{Ly6C}^{\text{high}}$) im Vergleich Isotyp- vs. RB6-8C5-Behandlung. Sekundärantikörper-gebundene Zellen sind in Rot markiert.

Bei einer mehrfachen Injektion des Depletionsantikörpers (alle 48 Stunden ab dem Tag der Lymphodepletion) ließen sich im Verlauf zunehmend mit anti-Gr-1 mAk gebundene MDSC ($\text{CD45.2}^+ \text{CD11b}^+ \text{MHCII}^- \text{Ly6C}^+$) durch den Sekundärantikörper nachweisen (Abb. 14 A, Balkendiagramm). Während am Tag 2 nur 10 % aller MDSC eine Bindung mit dem Depletionsantikörper aufwiesen, waren es am Tag 4 und 7 ca. 60 % der Zellen (Abb. 14, A). Dabei waren RB6-8C5-gebundene MDSC teilweise in den PMN- oder M-MDSC-Gates darstellbar, oder zeigten sich im $\text{Ly6C}^{\text{mid}} - \text{Ly6G}^-$ - Bereich der $\text{Ly6C} - \text{Ly6G}$ - Plots (Abb. 14, B). Um den Langzeit-Depletionsverlauf von MDSC nach wiederholter Anwendung von RB6-8C5 besser beurteilen zu können, wurden die PMN- und M-MDSC an verschiedenen Versuchszeitpunkten bis zum Tag 24, zusammen mit dem Anteil der MDSC, die eine Bindung mit RB6-8C5 aufwiesen, in einem Diagramm dargestellt (Abb. 15).

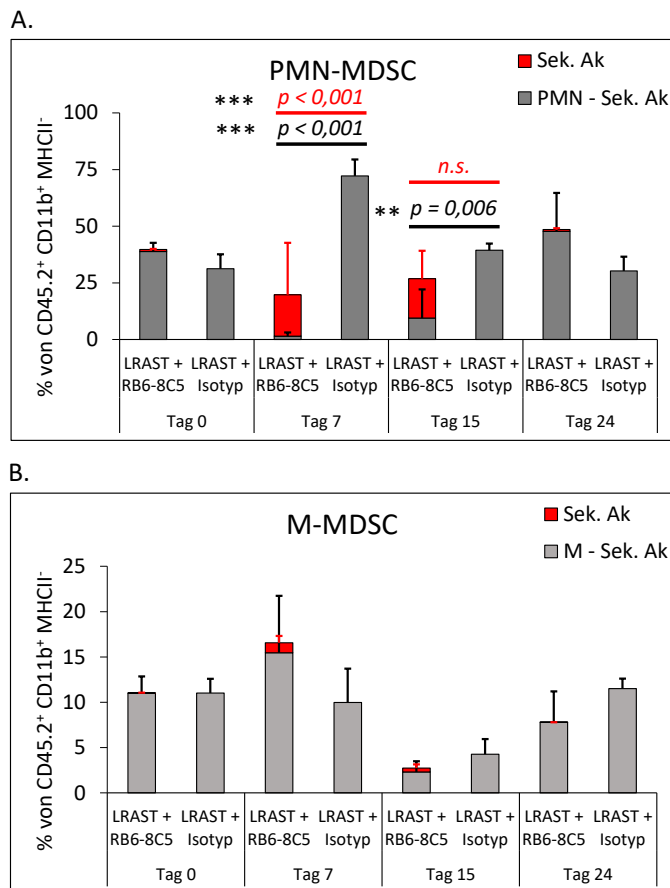


Abb. 15: Depletion von PMN- und M-MDSC im Langzeitverlauf. C57BL/6 Mäuse erhielten 5×10^4 D5-Zellen durch s.c. Injektion und wurden nach LRAST-Schema + MDSC-Depletion behandelt: Cyclophosphamid (L) + aktiv-spezifische Vakzinierung (AST) + anti-Gr-1 mAk (RB6-8C5). Die Kontrollgruppe mit D5-Tumortragenden Mäusen erhielt Isotyp-Antikörper analog zur MDSC-Depletion. RB6-8C5 (230 μg) oder eine äquivalente Menge Isotyp-Antikörper wurden alle 48 Stunden ab dem Tag der Lymphodepletion (Tag 0) injiziert (jeweils $n = 3-4$). Durchflusszytometrische Messungen wurden an den Tagen 0, 7, 15 und 24 aus peripherem Blut durchgeführt. Darstellung des prozentualen Anteils von PMN-MDSC (A.) und M-MDSC (B.) an den $\text{CD45.2}^+ \text{CD11b}^+ \text{MHC-II}^-$ Leukozyten als Balkendiagramm \pm SD. Der prozentuale Anteil der mit Sekundärantikörper beladenen (Sek. Ak; = RB6-8C5-gebundenen) PMN- und M-MDSC an den $\text{CD45.2}^+ \text{CD11b}^+ \text{MHC-II}^-$ Zellen ist in Rot dargestellt. Signifikanzen wurden jeweils für den

Gesamtanteil der MDSC an CD45.2^+ Zellen (p – Werte in Rot dargestellt \triangleq einschließlich RB6-8C5-gebundener Zellen) und für die jeweiligen MDSC-Population abzüglich der RB6-8C5-gebundenen Zellen (p – Werte in Schwarz dargestellt) mittels zweifaktorieller ANOVA berechnet.

Am Tag 7 betrug der Anteil der PMN-MDSC ohne RB6-8C5-Bindung in der Gruppe LRAST + RB6-8C5 nur 1,5 %, gegenüber 72,2 % PMN-MDSC in der Kontrollgruppe. RB6-8C5-gebundene PMN machten bei LRAST + RB6-8C5 behandelten Mäusen zu diesem

Zeitpunkt 18,2 % aus (Abb. 15, A). Auch einschließlich der RB6-8C5 - gebundenen PMN-MDSC war die Abnahme der Zellzahl gegenüber der Gruppe LRAST + Isotyp statistisch signifikant ($p < 0,001$). Am Tag 15 war nur die Frequenz ungebundener PMN-MDSC aus der MDSC-Depletionsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe signifikant reduziert ($p = 0,006$). Die Summe aus PMN-MDSC mit Sekundärantikörperbindung und ungebundenen PMN-MDSC LRAST + RB6-8C5 behandelter Versuchstiere unterschied sich jedoch nicht mehr signifikant von der Zellzahl der PMN-MDSC aus der Kontrollgruppe (LRAST + RB6-8C5: 26,8 %; LRAST + Isotyp: 39,4 %; $p = 0,7$). Am Tag 24 kam es trotz weiterer Verabreichung der Depletionsantikörper zu einem Wiederanstieg der PMN-MDSC auf ca. 48 %. In der Gruppe LRAST + RB6-8C5 waren nun mehr PMN-MDSC als in der Kontrollgruppe (30,3 %, Tag 24) und dem Ausgangswert (38,8 %, Tag 0) nachweisbar.

Die Frequenz monozytärer MDSC unterschied sich zu keinem Messzeitpunkt signifikant zwischen den beiden Versuchsgruppen. Eine Abnahme der M-MDSC durch Anwendung von anti-Gr-1 mAk ließ sich nicht beobachten (Abb. 15, B). Von Tag 0 bis Tag 15 sank der prozentuale Anteil der M-MDSC auf 2,3 % (LRAST + RB6-8C5) bzw. 4,3 % (LRAST + Isotyp) und stieg dann bis zum Tag 24 wieder in beiden Gruppen auf 7,8 % bzw. 11,5 % an. Mit Sekundärantikörper beladene M-MDSC konnten lediglich am Tag 7 und Tag 15 gemessen werden und entsprachen nur einem geringen Anteil aller M-MDSC zum jeweiligen Messzeitpunkt (Tag 7: 1,1 %, Tag 15: 0,4 %).

4.5 Die Wirksamkeit von LRAST in D5-Melanom tragenden Mäusen

Die Induktion tumorspezifischer T-Zellen und das Tumorwachstumsverhalten des schwach immunogenen D5-Melanoms wurden nach LRAST, mit oder ohne Depletion myeloider Suppressorzellen untersucht. Hierzu wurden C57BL/6 - Mäuse drei Tage nach subkutaner Tumorinokulation dem LRAST-Schema folgend behandelt (Abb. 3, Material und Methoden). Die Depletion der MDSC erfolgte durch die i.p. Gabe von monoklonalen anti-Gr-1 Antikörpern (RB6-8C5).

Wir untersuchten die Induktion tumorspezifischer T-Zellen anhand der tumorspezifischen IFN - γ - Freisetzung aus Zellen der axillären und inguinalen Tumorstimulierenden Lymphknoten (TVDLN) der Versuchstiere in Kurzzeitversuchen (Abb. 16, gelber Teil). Zusätzlich wurde in Langzeitversuchen das subkutane Wachstum der D5-Tumore nach Anwendung des LRAST-Behandlungsschemas, mit oder ohne MDSC-Depletion ausgewertet (Abb. 16, grüner Teil).

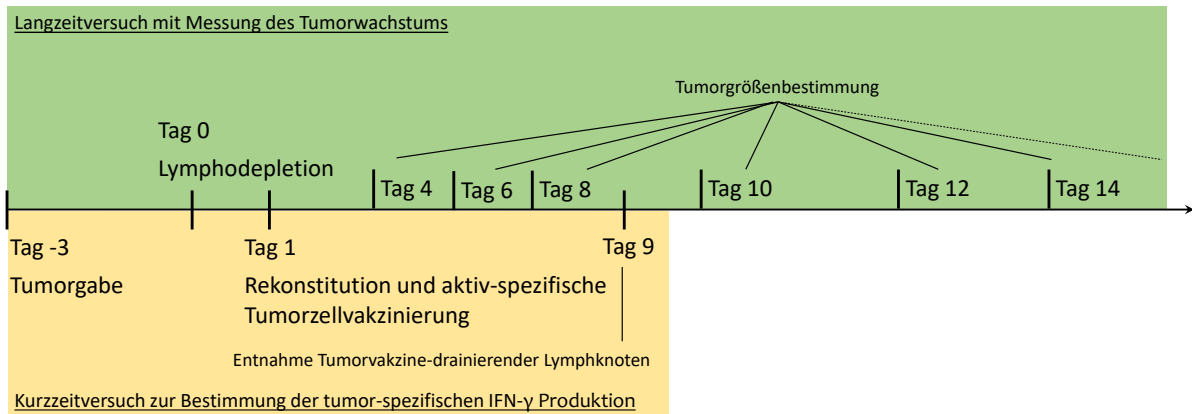
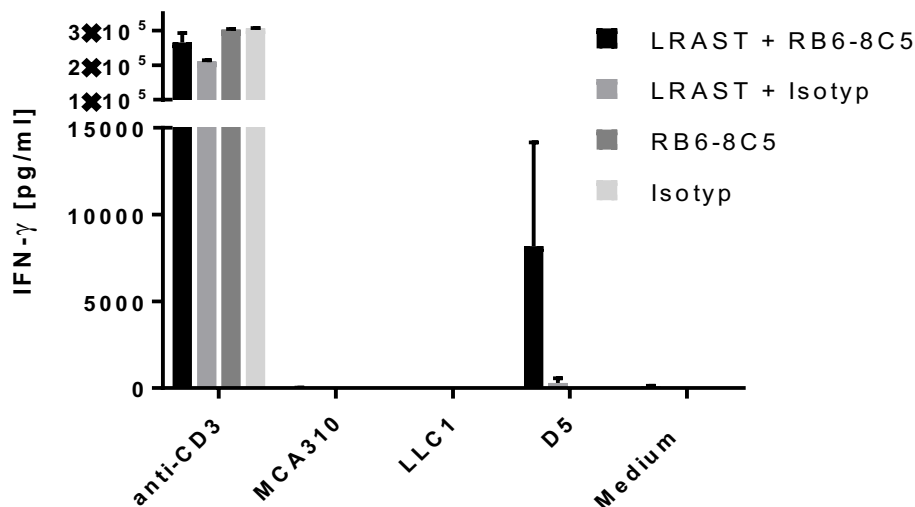


Abb. 16: Zeitachse für Lang- und Kurzzeitversuche.

4.5.1 Tumorspezifische IFN- γ Produktion

Die axillären und inguinalen Lymphknoten der Versuchstiere wurden geerntet, verarbeitet und die Zellen anschließend mit anti-CD3 mAk polyklonal stimuliert. Die Bestimmung des freigesetzten IFN- γ erfolgte aus den Zellüberständen der TVDLN, die zusammen mit D5-Melanomzellen oder Kontrolltumorzelllinien kultiviert wurden.

Abb. 17: Tumorspezifische IFN- γ -Freisetzung aus TVDLN.

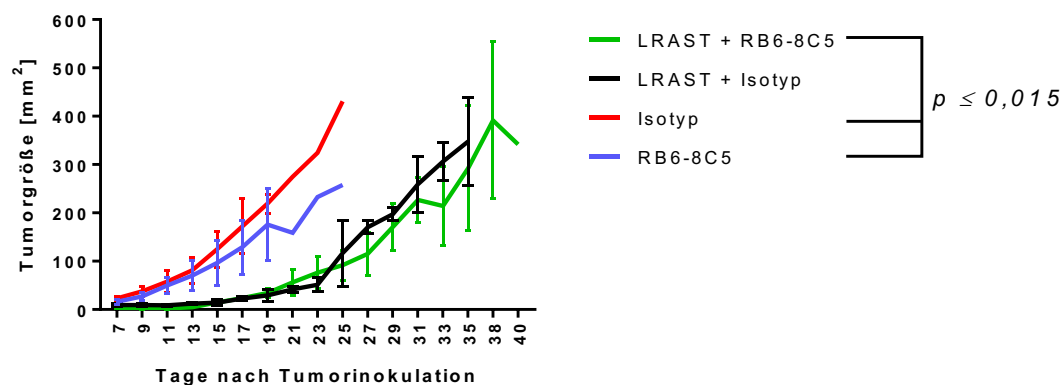
C57BL/6-Mäusen wurden insgesamt 20×10^4 (je 5×10^4) D5-Tumorzellen s.c. extremitätennah in die Flanken injiziert und anschließend eine Behandlung mit LRAST, mit oder ohne MDSC-Depletion, durchgeführt (jeweils $n=2-4$). Tötung der Mäuse am Tag 9 nach Lymphodepletion und Entnahme axillärer und inguinaler Lymphknoten. TVDLN wurden mit anti-CD3 mAk stimuliert und mit IL-2 expandiert. Die Bestimmung der tumorspezifischen IFN- γ -Produktion aus den TVDLN erfolgte nach Inkubation mit D5-Tumorzellen, oder den Kontrolltumorzelllinien MCA310 und LLC1. Als Kontrolle diente die Inkubation der TVDLN in mit anti-CD3 mAk beschichteten Wells (Positivkontrolle), oder in Zellkulturmedium auf RPMI-Basis (Negativkontrolle), jeweils ohne Tumorzellen. Balken geben die Mittelwerte mit Standardfehler wieder. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA.

Gegenüber mit Kontrollantikörpern behandelten Mäusen (Abb. 17, Isotyp) wiesen die TVDLN aus LRAST-behandelten Mäusen ohne MDSC-Depletion (LRAST + Isotyp) eine erhöhte, D5-spezifische Freisetzung von IFN- γ auf (577 pg/ml). Durch Kombination der LRAST-Behandlung mit der regelmäßigen i.p. Anwendung von Antikörpern gegen MDSC zeigte sich eine deutliche Steigerung der tumorspezifischen IFN- γ -Freisetzung auf durchschnittlich 8193 pg/ml. Die alleinige MDSC-Depletion (RB6-8C5) führte, wie die alleinige Gabe des Kontrollantikörpers (Isotyp), zu keiner vermehrten Zytokinproduktion der TVDLN.

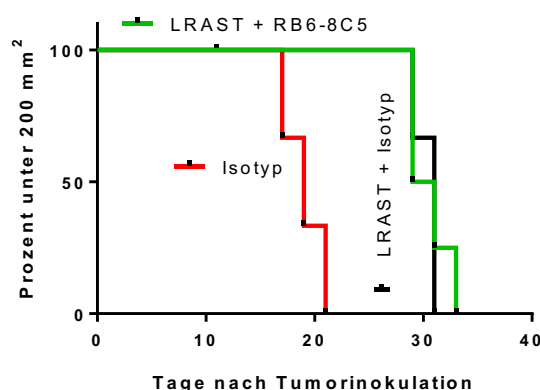
4.5.2 Tumorwachstum nach LRAST mit oder ohne MDSC-Depletion

Im Langzeitversuch verglichen wir das s.c. Tumorwachstum des D5-Melanoms bei Versuchstieren in verschiedenen Behandlungsarmen mit oder ohne LRAST, oder die Anwendung von MDSC-Depletionsantikörpern (RB6-8C5). Ziel war es die Wirksamkeit von LRAST in Abhängigkeit von MDSC zu untersuchen.

A.



B.



C.

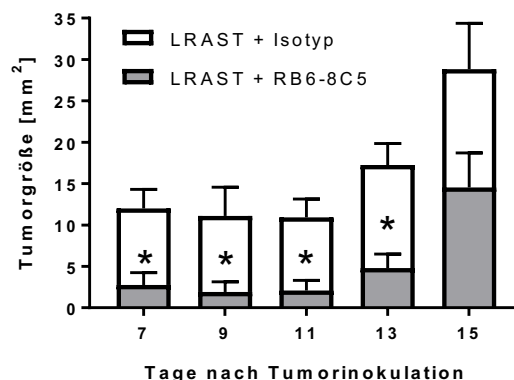


Abb. 18: Vergleich des Tumorwachstumsverhaltens für verschiedene Behandlungsgruppen. C57BL/6 Mäuse erhielten 5×10^4 D5-Zellen durch s.c. Injektion in eine Flanke und wurden nach LRAST-Schema (Cyclophosphamid (L), Rekonstitution (R) und aktiv-spezifische Vakzinierung (AST)), mit LRAST + RB6-8C5, oder nur mit RB6-8C5 zur MDSC-Depletion behandelt (jeweils $n = 3-4$). RB6-8C5 (230 μ g anti-Gr-1-mAk) wurden alle 48 Stunden i.p. verabreicht. Mäuse ohne RB6-8C5-Injektion erhielten die gleiche Menge eines Kontrollantikörpers. Kontrollgruppen erhielten nur RB6-8C5 oder nur Isotyp-

Antikörper. Das Tumorwachstum wurde ab Tag 7 nach Tumorinokulation jeden 2. Tag mittels Schublehre erfasst und der jeweils größte und kleinste Diameter dokumentiert. **A.** Darstellung des Tumorwachstums in mm² für alle Gruppen mit Mittelwerten und SD. **B.** Vergleich der Gruppen LRAST + RB6-8C5, LRAST + Isotyp und Isotyp aus Abb. 18 A. „Kaplan-Meier“-Darstellung für Versuchstiere deren s.c.-Tumoren eine Tumorgöße von 200 mm² noch nicht überschritten haben. **C.** Vergleich des Tumorwachstumsverhaltens der Gruppen LRAST mit /ohne MDSC-Depletion (\pm RB6-8C5) aus Abb. 18 A. Das Tumorwachstum ist im Zeitraum von Tag 7 bis Tag 15 als Balkendiagramm \pm SD für entsprechende Gruppen wiedergegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA.

Versuchstiere mit LRAST + RB6-8C5-Behandlung wiesen zu jedem Zeitpunkt signifikant kleinere Tumore im Vergleich zu Mäusen aus den beiden Kontrollgruppen Isotyp und RB6-8C5 auf (p jeweils $\leq 0,015$, Abb. 18, A). Im Verlauf kam es jedoch bei allen Versuchstieren, unabhängig von der Behandlung, zum Auswachsen der Tumore. Alle Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe (Isotyp) wiesen nach 21 Tagen eine Tumorgöße über 200 mm² auf (Abb. 18, B). Bei den LRAST - Gruppen (\pm MDSC-Depletion mit RB6-8C5) zeigte sich ein deutlich verzögertes Tumorwachstum. In der Gruppe LRAST + Isotyp wurde im Mittel erst nach weiteren 10 Tagen und in der Gruppe LRAST + RB6-8C5 erst nach weiteren 12 Tagen bei 100 % der Versuchstiere die Tumorgöße von 200 mm² überschritten (Abb. 18, B).

In der Anfangsphase der Behandlung (Tage 7, 9, 11 und 13 nach Tumorinokulation) unterschied sich das Tumorwachstumsverhalten auch innerhalb der LRAST behandelten Versuchstiere signifikant. Die zusätzliche Depletion von MDSC (LRAST + RB6-8C5) konnte das Tumorwachstum gegenüber dem Verlauf bei Mäusen, die nur mit LRAST (LRAST + Isotyp) behandelt wurden, signifikant verlangsamen (Abb. 18, C). Eine deutliche Tumorgößenprogredienz der mit LRAST + RB6-8C5 behandelten Mäuse zeigte sich auch makroskopisch erst ab Tag 15 an der Inokulationsstelle.

Bei Versuchstieren, die ausschließlich den Depletionsantikörper (RB6-8C5) erhielten, fand sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Isotyp) keine signifikante Verzögerung des Tumorwachstums (Abb. 18, A).

5. Diskussion

Tumore exprimieren Antigene, die den Effektorzellen des Immunsystems als Angriffspunkt zur Bekämpfung der Erkrankung dienen können. [186] Einen wesentlichen Beitrag zur Tumorbekämpfung tragen zytotoxische tumorspezifische T-Zellen bei. Sie werden im Regelfall durch Präsentation entsprechender tumorspezifischer Antigene auf dafür spezialisierten Zellen, z.B. dendritischen Zellen, aktiviert und expandieren klonal. Treffen tumorspezifische T-Zellen auf Tumorzellen, die ein Antigen aufweisen, gegen das sie gerichtet sind, kann ihre Wirkung durch ein immunsuppressives Mikromilieu so eingeschränkt sein, dass die weitere Migration in den Tumor, wie auch die Zerstörung der entarteten Zellen beeinträchtigt ist. [45, 144, 187] Myeloide Suppressorzellen (MDSC) sind ein wichtiger Bestandteil immunevasiver Mechanismen von Tumoren und tragen wesentlich zum immunsuppressiven Mikromilieu bei. In Mäusen mit etablierten soliden Tumoren und Patienten mit maligner Tumorerkrankung akkumulieren sie in Blut, Milz, Knochenmark und im Tumor. Sie hemmen die Funktion von T-Zellen, darunter auch die antigenabhängige und -unabhängige Wirkung von tumorspezifischen T-Effektorzellen. [59, 66, 80] Im Rahmen dieser Arbeit wurde in Mäusen mit etablierten D5-Melanomen die Auswirkung der MDSC auf die Induktion tumorspezifischer Effektormechanismen nach Behandlung mit dem Immuntherapiekonzept LRAST untersucht.

Unter dem Oberbegriff myeloider Suppressorzellen wurden phänotypisch die polymorphonukleären (PMN-MDSC: Ly6G⁺ Ly6C⁺) und die monozytären (M-MDSC: Ly6G⁻ Ly6C^{high}) MDSC aus der Population der CD11b⁺ MHC-II⁻ myeloiden Zellen zusammengefasst und jeweils getrennt betrachtet. Während der durchflusszytometrischen Auswertung konnte durch das Auftrennen in CD45.1⁺ oder CD45.2⁺ Zellen differenziert werden, ob die MDSC der jeweiligen Empfängermaus (CD45.2⁺) oder dem Rekonstitutionsprodukt aus Milzzellen der Spendermäuse (CD45.1⁺) entstammen. Versuchstiere, die mit LRAST behandelt wurden, wiesen in den Milzen und im peripheren Blut eine zwischenzeitliche signifikante prozentuale Zunahme der CD11b⁺ MHCII⁻ Zellen und eine starke, zum Teil signifikante Zunahme beider MDSC-Populationen auf, die nicht aus dem Zellpool des Rekonstitutionsproduktes rekrutiert wurden. Die höchsten Zellfrequenzen für CD45.2⁺ CD11b⁺ MHC-II⁻ Zellen, sowie PMN- und M-MDSC konnten dabei am Tag 10 (Milz) und Tag 7 (Blut), jeweils nach CTX-Gabe festgestellt werden.

Dass myeloide Zellen und damit potentiell auch MDSC von vornherein nicht mit dem Rekonstitutionsprodukt in die Empfängermaus übertragen wurden, konnten wir ausschließen, da in der Milz für CD45.2⁺ und CD45.1⁺ myeloide Zellen ähnliche Ausgangswerte gemessen wurden. Die anschließende abweichende Dynamik der Zellfrequenzen erklärt sich am ehesten

dadurch, dass MDSC als unreife Zellen hauptsächlich dem Knochenmark entstammen und in dem Rekonstitutionsprodukt aus Spendermilzzellen die Zellvorstufen für die Neubildung myeloider Suppressorzellen fehlen. [188] Aufgrund des engen zeitlichen Bezugs zwischen Lymphodepletion und Immunzellrekonstitution und angesichts der beobachteten verstärkten frühen Apoptose innerhalb der Fraktion der CD45.1⁺ Zellen in der Milz von Mäusen, die mit Cyclophosphamid behandelt worden sind, ist auch ein isolierter zytotoxischer Effekt von CTX oder seiner Metabolite auf die CD45.1⁺ myeloiden Zellen denkbar. Eine gravierende Schädigung des Rekonstitutionsprodukts ist unwahrscheinlich, da die CD45.1⁺ Leukozyten über vier Wochen hinweg einen stabilen und prozentual zunehmenden Anteil an den wirtseigenen CD45.2⁺ Leukozyten ausmachten und am Ende der Verlaufsbeobachtung in Milz, Blut und Tumor weiterhin nachweisbar waren. Der in der lymphodepletierten Gruppe, verglichen mit den CD45.2⁺ wirtseigenen Leukozyten höhere prozentuale Anteil früh-apoptotischer Zellen, sowie der niedrigere Anteil vitaler Zellen innerhalb der CD45.1⁺ rekonstituierten Zellen, könnte auch auf den Prozess der Milzzellverarbeitung und i.v. Injektion zurückgehen.

Ein entscheidender Beitrag der rekonstituierten CD45.1⁺ MDSC an der Hemmung der T-Zell-Rekrutierung zum Tumor und ihrer tumorspezifischen Effektorfunktion, sowie die Mitgestaltung eines immunsuppressiven Tumormikromilieus ist daher insgesamt unwahrscheinlich. Insbesondere, da keine relevante Anreicherung rekonstituierter Zellen mit dem Phänotyp von MDSC im Tumor nachgewiesen werden konnte. Eine auf Zellbasis stärkere Ausprägung immunsuppressiver Mechanismen trotz insgesamt niedrigerer Zellzahl, lässt sich jedoch nicht ausschließen.

Die Zunahme empfängereigener (CD45.2⁺) MDSC, steht im Einklang mit Ergebnissen von Salem *et al.*, die in C57BL/6-Mäusen nach Verabreichung von 4 mg CTX i.p. pro Maus einen relativen und absoluten Anstieg von MDSC (CD11b⁺ Ly6G⁺) in Blut, Milz und Knochenmark der Versuchstiere feststellten. Die höchsten Werte wurden jeweils am Tag 6 beschrieben und ein Rückgang auf die Ausgangswerte im Blut am Tag 12, sowie in der Milz und im Knochenmark am Tag 15 gesehen. [189] Wir verwendeten 200 mg CTX pro kg Körpergewicht des jeweiligen Versuchstieres. Angesichts des nahezu gleichen Alters der Mäuse und dem entsprechenden Gewicht bei konstanten Haltungsbedingungen wurde, entsprechend der Versuche von Salem *et al.* [189], ebenfalls ca. 4,0 mg CTX pro Versuchstier i.p. appliziert. Neben den positiven immunmodulierenden Eigenschaften niedrigdosierten Cyclophosphamids, zu denen die Reduktion regulatorischer T-Zellen zählt, sollte auch eine potentielle immuninhibierende Wirkung durch Zunahme der MDSC diskutiert werden, was zu einer Hemmung tumorspezifischer CD4⁺ und CD8⁺ Zellen führen kann. [190-192] Dafür

verantwortlich sind Faktoren, wie GM-CSF, IL-1 β , IL-5, IL-10, IFN- γ und TNF- α , die nach niedrigdosierter CTX-Gabe im Tumormikromilieu zu finden und mit einer erhöhten Zellzahl an MDSC, Verstärkung ihrer suppressiven Funktion und vermehrter Hemmung der T-Zell-Proliferation assoziiert sind. [193, 194] Insbesondere GM-CSF, welches von zahlreichen humanen und murinen Tumorzelllinien produziert wird, kann nachweislich eine Rekrutierung und Anreicherung von myeloiden Suppressorzellen in sekundären lymphatischen Organen, mit konsekutiver Suppression antigenspezifischer CD8⁺-T-Zellen, hervorrufen. [56, 188, 195] Neben CTX stellt sich also auch für das Zytokin GM-CSF, ein potentieller tumorbegünstigender Beitrag heraus, insbesondere da es in unseren Versuchen nicht nur durch CTX induziert werden konnte, sondern auch durch die D5G6 – Tumorstoffe aktiv freigesetzt wurde. Zur Abschätzung der ungefähren GM-CSF Freisetzung durch die D5G6-Zellen in der Maus, wurde die GM-CSF-Sekretion der Zellen *in vitro* nach Bestrahlung mit 10.000 rad bestimmt. Unmittelbar nach Bestrahlung setzten die D5G6-Zellen 154 ng GM-CSF / 1x10⁶ Zellen / 24h frei. Nach sechs Tagen in Kultur stieg die Sekretion auf 172 ng GM-CSF / 1x10⁶ Zellen / 24h (Daten nicht gezeigt).

Serafini *et al.* beschrieben für GM-CSF ein dosisabhängiges Wirkungsverhältnis. [196] Die Autoren stellten in Untersuchungen mit der vom B16-Melanom abstammenden Zelllinie B78H1-GM fest, dass es ab einer GM-CSF-Freisetzung von 1500 ng / 10⁶ Zellen / 24 h der mit 5000 rad bestrahlten Tumorstoffe zu einer Rekrutierung myeloider Suppressorzellen und damit verbunden zu einer Unterdrückung der antigenabhängigen T-Zell-Antwort kam. Bei der therapeutischen Anwendung einer nur 300 ng GM-CSF / 10⁶ Zellen / 24 h sezernierenden Tumorstoffe konnte eine effektive anti-Tumor Immunantwort und eine Tumorregression nachgewiesen werden. Ein Anstieg myeloider Suppressorzellen blieb unter diesen Bedingungen aus. [196] Interessanterweise wurden die höchsten GM-CSF-Werte 24-36 Stunden nach Vakzinierung ermittelt. 3 Tage nach Verabreichung der Vakzine zeigte sich *in vivo* keine weitere GM-CSF-Produktion mehr. Bei Verwendung einer Vakzine, die 1500 ng GM-CSF / 10⁶ Zellen / 24 h oder mehr produzierte, wurden maximale Zellkonzentrationen myeloider Suppressorzellen am Tag 3 und insbesondere in der Milz festgestellt. [196] In unserer Arbeit lag die *in vitro* GM-CSF-Freisetzung der Tumorstoffe mit 154 – 172 ng GM-CSF (pro 10⁶ Zellen und 24 h) noch unter der von Serafini *et al.* beschriebenen therapeutischen Dosis von 300 ng GM-CSF / 10⁶ Zellen / 24 h [196] und damit auch weit unterhalb des maximalen Schwellenwerts von 1500 ng GM-CSF / 10⁶ Zellen / 24 h, ab dem die Autoren eine Anreicherung von MDSC beschrieben hatten. Allerdings sahen wir in Vorversuchen ohne CTX-Anwendung („RAST“, Daten nicht gezeigt) ebenfalls einen Anstieg der MDSC-Zellfrequenzen im Zeitverlauf. Dies, zusammen mit der auch nach Tag 3 erhaltenen und

tendenziell ansteigenden *in vitro* Zytokinproduktion, deutet darauf hin, dass die MDSC-Anreicherung durch die D5G6-Zellen und das freigesetzte GM-CSF in unseren Versuchen mitbedingt ist. Im Unterschied zu den Ergebnissen von Serafini *et al.* [196] zeigte sich in unseren Versuchstieren erst ab Tag 7 ein deutlicher Anstieg der Frequenz myeloider Zellen und beider MDSC-Fraktionen im Blut und der Milz. Somit spricht die Zelldynamik, die eher mit den Ergebnissen der Versuche von Salem *et al.* übereinstimmt [189], dafür, dass die Induktion von MDSC im Rahmen der LRAST-Anwendung am ehesten dem CTX zuzuschreiben ist.

Obwohl PMN-MDSC in unterschiedlichen Tumormodellen deutlich stärker expandieren, ist das Proportionsverhältnis im Tumor umgedreht und es überwiegen die M-MDSC. [62, 92, 197] Hervorzuheben ist, dass M-MDSC im direkten Vergleich immunsuppressiver sind als PMN-MDSC. [92] Auch nach LRAST war die MDSC-Expansion insbesondere innerhalb der PMN-Fraktion zu sehen und es konnten signifikant mehr M-MDSC als PMN-MDSC im Tumor nachweisen werden. Die Chemotaxis der MDSC zum Tumor beruht auf Chemokinen und den entsprechenden Rezeptoren. Das Chemokinprofil, das zur Zellmigration führt, ist zellart- und tumorspezifisch. [90] Lesokhin *et al.* zeigten am Beispiel eines GM-CSF-freisetzenden murinen B16-Melanoms, dass die chronische Exposition mit GM-CSF eine Expansion, Aktivierung und Tumoranreicherung von präferentiell CCR2⁺ monozytären MDSC zur Folge hat, welche CD8⁺ T-Zellen supprimierten und ihre Infiltration in den Tumor einschränkten. [198] Diese Erkenntnis ist auf unser Modell allerdings nur partiell übertragbar, da auch die Tumoren unbehandelter D5-tragender Mäuse überwiegend durch Zellen mit den phänotypischen Markern von M-MDSC infiltriert waren (Daten nicht gezeigt). Trotzdem ist es denkbar, dass durch die chronische GM-CSF-Exposition der Versuchstiere durch die D5G6-Tumorvakzine der Anteil immunsuppressiver MDSC im Tumor ansteigt und dadurch tumorspezifische Effektorzellen vermehrt inhibiert werden. Dies wird gestützt durch die Beobachtung von Lesokhin *et al.*, dass CD11b⁺ Zellen, die aus B16-Tumoren (ohne GM-CSF-Produktion) oder den Milzen entsprechender Mäuse isoliert wurden, nicht zu einer Suppression von CD8⁺ T-Zellen führten. [198]

LRAST konnte das Tumorstadium gegenüber Mäusen aus den Kontrollgruppen verlangsamen, jedoch nicht aufhalten. Wir vermuteten, dass die therapeutische Effektivität des Behandlungsschemas durch die festgestellte Expansion von MDSC nach LRAST beeinträchtigt wird. Um daher die therapeutische Wirksamkeit von LRAST zu verbessern, führten wir eine MDSC-Depletion mit Antikörpern gegen das Gr-1 Epitop durch. Mehrere Gruppen konnten eine Reduktion oder sogar Depletion myeloider Suppressorzellen in Blut und Milz tumortragender Mäuse, sowie im Tumor selbst nach i.p. Gabe von anti-Gr-1 mAk (Klon RB6-8C5) zeigen. [199-202] Auch konnte gezeigt werden, dass durch die antikörpervermittelte

MDSC-Depletion mit RB6-8C5 eine Verkleinerung etablierter Tumore im Tiermodell erreicht werden kann. [201, 202]

Nach erfolgter MDSC-Depletion mit anti-Gr-1 mAk (RB6-8C5) und anschließenden durchflusszytometrischen Analysen kann es bei Verwendung von Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gleicher Klonalität zu falsch-negativen Ergebnissen kommen. Auch lassen sich die durch anti-Gr-1 mAk (Depletionsantikörper) gebundenen Zellen nicht mehr durch Fluorochrom-konjugierte anti-Ly6G mAk (Klon 1A8) darstellen, sodass diese Zellen in der durchflusszytometrischen Darstellung im jeweiligen Gate „unsichtbar“ werden. [203] Das beruht auf der Tatsache, dass Gr-1 ein gemeinsames Epitop der Moleküle Ly6G und Ly6C darstellt und anti-Gr-1 mAk gleichermaßen an beide Ly-Moleküle binden. [204, 205] Anti-Gr-1 (Klon RB6-8C5) und anti-Ly6G (Klon 1A8) mAk haben die gleiche Bindungsstelle und konkurrieren miteinander. Da aber anti-Ly6C mAk (Klon HK1.4) eine andere Bindungsstelle aufzuweisen scheinen, ist trotz auf der Zelloberfläche vorhandener RB6-8C5-mAk eine ungehinderte Bindung möglich. [206] Der Depletionserfolg konnte also durch Bestimmung der CD11b⁺ Ly6C⁺ MDSC - Gesamtpopulation überwacht werden, da beide MDSC - Subpopulationen Ly6C exprimieren. Durch den Depletionsantikörper gebundene Zellen konnten zusätzlich durch Verwendung von Sekundärantikörpern gegen gebundenes RB6-8C5 dargestellt und spezifisch den PMN- oder M-MDSC zugeordnet werden. Dies wurde unter anderem von Ma *et al.* und Ribechini *et al.* beschrieben und von uns in eigenen Experimenten bestätigt. [203-206]

Ma *et al.* konnten an drei verschiedenen murinen Tumormodellen, darunter auch beim B16-Melanom, nachweisen, dass die i.p. Gabe von 200 µg anti-Gr-1 mAk (RB6-8C5) nach 24 Stunden zu einer Reduktion und teilweise kompletten Depletion von CD11b⁺ Ly6G⁺ Zellen in der Milz und dem Blut tumortragender Mäuse führt. Interessanterweise fand sich 24 Stunden, sowie 2 und 4 Tage nach einmaliger MDSC-Depletion eine Persistenz von CD11b⁺ Ly6C⁺ MDSC in der Leber, während zu den gleichen Messzeitpunkten eine deutliche Reduktion in Milz und Blut erreicht werden konnte. [206] Ferner konnte durch Anwendung von Sekundärantikörpern gezeigt werden, dass die MDSC in der Leber persistierten und durch die Depletionsantikörper gebunden waren, während an den Tagen 1, 2 und 4 in Blut und Milz kaum CD11b⁺ Zellen zu finden waren, die den Sekundärantikörper auf der Oberfläche gebunden hatten. Während einerseits ein vermehrter Zelltod RB6-8C5-gebundener MDSC nachgewiesen werden konnte, kam es andererseits zu einer vermehrten Migration neu gebildeter MDSC in die Leber. Die Bindung der Zellen mit dem Depletionsantikörper führte nicht zu einer Abnahme der Immunsuppressivität der MDSC. [206]

Wir konnten in unserem Tumormodell ebenfalls zeigen, dass eine erfolgreiche Depletion myeloider Suppressorzellen durch Anwendung von anti-Gr-1 mAk möglich ist. Im Gegensatz zu Ma *et al.* [206] und anderen [199, 201, 207], die CD11b⁺ Ly6C⁺, bzw. CD11b⁺ Gr-1⁺ Gesamt-MDSC betrachteten, wurde in dieser Arbeit der Depletionserfolg für beide MDSC-Subpopulationen getrennt untersucht. An den Tagen 2 und 4, jeweils 48 Stunden nach i.p. Gabe von 230 µg anti-Gr-1 mAk (RB6-8C5) zeigte sich eine signifikante Depletion von PMN-MDSC, ohne dass im PMN-Gate RB6-8C5-gebundene Zellen durch Sekundärantikörper nachweisbar waren. M-MDSC waren 48 Stunden nach Gabe von anti-Gr-1 mAk reduziert, jedoch nicht vollständig depletiert. An beiden Tagen fanden sich dabei RB6-8C5-gebundene Zellen im M-MDSC-Gate. Die Frequenz Depletionsantikörper-gebundener MDSC (CD11b⁺ Ly6C⁺ Sek. Ak⁺) nahm im Blut von Mäusen mit etablierten D5-Tumoren ab dem vierten Tag nach Beginn der Antikörpergabe erheblich zu. Entsprechend den Beobachtungen von Ma *et al.* für Leber-ständige MDSC, ist es möglich, dass diese Zellen trotz Bindung mit Depletionsantikörpern weiterhin immunsuppressive Eigenschaften aufweisen und eine Hemmung der T-Zell-Proliferation und Funktion verursachen. [206] Dabei können die Antikörper bis zu vier Tage an den MDSC gebunden bleiben. [204]

Durch regelmäßige intraperitoneale Injektionen des MDSC-Depletionsantikörpers alle 48 Stunden, sollte eine dauerhafte Depletion myeloider Suppressorzellen erreicht und der Anstieg von PMN- und M-MDSC in Blut (Tag 7) und Milz (Tag 10) nach LRAST abgefangen werden. Srivastava *et al.* verwendeten in vergleichbarer Weise 200 µg anti-Gr-1 mAk (RB6-8C5) alle 48 Stunden für insgesamt 4 Wochen. [201] Die Therapie wurde eine Woche nach 3LL - Tumorinokulation begonnen und führte zu einer signifikanten Reduktion von Tumolvolumen und -gewicht, sowie zu einer Reduktion der CD11b⁺ Gr-1⁺ Zellen in Tumor, Blut, Milz und Knochenmark. [201] Auch Zhang *et al.* konnten durch i.p. Anwendung von anti-Gr-1 mAk (RB6-8C5; 250 µg) alle drei Tage, beginnend 14 Tage nach 3LL-Tumorinokulation, eine signifikante Reduktion des Anteils tumorinfiltrierender MDSC, eine Verzögerung des Tumorstwachstums und ein verlängertes Überleben der Versuchstiere erzielen. [202] Allerdings kann in beiden Fällen eine überschätzte MDSC-Depletion durch Verwendung von anti-Gr-1 mAk gleicher Klonalität zur Depletion und in konjugierter Form zur Visualisierung nicht ausgeschlossen werden. In unseren Experimenten stellten wir im Langzeitverlauf der MDSC-Depletion bis Tag 15 nach Lymphodepletion eine signifikante Reduktion der PMN-MDSC, jedoch einen im Verlauf der Depletionsbehandlung zunehmenden Anteil Sekundärantikörper-gebundener PMN-MDSC fest. Am Tag 15 war nur noch der Anteil der PMN-MDSC signifikant reduziert, der keine Depletionsantikörperbindung aufwies.

Wir konnten also den beobachteten Anstieg der PMN-MDSC nach LRAST durch repetitive Gabe von anti-Gr-1 mAk abfangen, jedoch keine dauerhafte Depletion der PMN-MDSC erzielen. Zudem ist zu bedenken, dass zu den Zellen, die im PMN-Gate (mit oder ohne Sekundärantikörperbindung) nachweisbar waren, noch diejenigen hinzugerechnet werden müssen, die erst durch die Bindung mit den Sekundärantikörpern demaskiert und im Ly6G-negativen Bereich des Ly6G / Ly6C - Plots darstellbar waren. Ribechini *et al.* hatten ebenfalls den Effekt eines „Ly-Phänotyp-*shifts*“ gesehen, der darauf zurückgeht, dass bei Bindung von anti-Gr-1 mAk des Klons RB6-8C5 (Depletionsantikörper) keine fluoreszenzmarkierten anti-Gr-1 mAk gleicher Klonalität oder anti-Ly6G mAk (Klon 1A8) die Zellen in der FACS-Analyse sichtbar machen können. [204] Falls die Zellen nicht gleich depletiert werden, können sie, da die anti-Ly6C-Bindung nicht eingeschränkt ist, durch fluoreszenzmarkierte anti-Ly6C mAk angefärbt werden und tauchen im Ly6G-negativen Bereich des Ly6G / Ly6C – Plots auf. Mit „*shift*“ ist in der Arbeit von Ribechini *et al.* demnach das Auftauchen einer maskierten Zellpopulation in einen anderen Ly-Bereich, bei gleichbleibenden Gesamtverhältnissen, gemeint. [204] In unseren Versuchen führte der unterschiedliche Grad der Gr-1-Epitopsättigung während der Zellfrequenzzunahme der PMN-MDSC nach LRAST dazu, dass PMN-MDSC im Ly6G-positiven und -negativen Bereich zu sehen waren, was bei sequentieller Messung von Zellen der gleichen Maus das Bild eines „*shifts*“ ergab. Ein relativer Depletionsantikörpermangel durch den Zellfrequenzanstieg führte also wahrscheinlich dazu, dass es neben vollständig maskierten PMN-MDSC (vollständige Gr-1-Epitopsättigung, sichtbar im Ly6G-negativen Bereich), auch diejenigen gab, die zwar durch anti-Gr-1 mAk gebunden waren und demnach auch durch Sekundärantikörper sichtbar gemacht werden konnten, aber gleichzeitig noch freie Epitope für fluoreszenzmarkierte anti-Ly6G mAk zur Verfügung hatten (sichtbar im Ly6G-positiven Bereich).

Für M-MDSC konnten wir im Zeitraum, in dem die Frequenz der PMN-MDSC erfolgreich reduziert werden konnte, keine Depletion im Blut feststellen. Am Tag 15 nach Lymphodepletion beobachteten wir unabhängig von der Anwendung der Depletionsantikörper einen deutlichen, jedoch nicht signifikanten Rückgang der Frequenz von M-MDSC LRAST-behandelter Mäuse. Nur 0,4 % der Zellen wiesen zu diesem Messzeitpunkt eine Bindung mit dem Depletionsantikörper auf, sodass unwahrscheinlich ist, dass der Effekt auf die Wirkung von RB6-8C5 zurückzuführen ist, wenn auch zuvor keine signifikante Depletion nachweisbar war. Auch die deutliche Infiltration der D5-Tumore mit M-MDSC konnte durch RB6-8C5 nicht reduziert werden (Daten nicht gezeigt). Kumar *et al.* fanden ebenfalls, dass nach 4-maliger Gabe von RB6-8C5 mAk über 2 Wochen keine Depletion von M-MDSC im Tumor nachweisbar war, obwohl beide MDSC-Subpopulationen im Blut depletiert werden konnten.

[208] Ribechini *et al.* stellten in diesem Zusammenhang fest, dass Ly6C^{int-high} Zellen im Knochenmark behandelter Mäuse, sowohl 48 Stunden nach einmaliger Antikörpergabe unbeeinträchtigt bleiben, als auch nach repetitiver i.p. Anwendung von RB6-8C5 mAk über sieben Tage nicht depletiert wurden. Dabei wurden 250 µg eines kommerziell erhältlichen anti-Gr-1 mAk, oder eine äquivalente Menge eines serumfreien RB6-8C5 Hybridomüberstandes verwendet. [204] Dass CD11b⁺ Ly6C⁺ Zellen in der Peripherie, nicht jedoch im Knochenmark depletiert werden, fanden auch Condamine *et al.* am Tag 2 und 4 nach einmaliger i.p.-Anwendung von anti-Gr-1 mAk. [199] Trotzdem legt die am Tag 2, also in zeitlicher Nähe zur ersten RB6-8C5-Gabe gesehene Abnahme der M-MDSC und die Darstellung einer RB6-8C5-Bindung auf ihrer Zelloberfläche mittels Sekundärantikörper in unseren Versuchen nahe, dass auch die monozytären MDSC von den Depletionsantikörpern beeinflusst werden. Es ist insgesamt bekannt, dass die Depletion von MDSC mit RB6-8C5 sowohl vom zeitlichen Ablauf, in der Ausprägung auf die beiden Subpopulationen, als auch organbezogen deutliche Unterschiede zeigen. [203, 209] Welchen Einfluß die einzelnen Komponenten von LRAST auf die MDSC-Depletion haben und welche Mechanismen zugrunde liegen, sodass die Depletion insbesondere auf PMN-MDSC wirkt, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht betrachtet und bedarf weiterer funktioneller Experimente.

Das Typ-I Zytokin IFN – γ hat einen hohen Stellenwert im Rahmen tumorgerichteter Therapien und Zellantworten. [210-212] Es trägt wesentlich zur Tumorzellzerstörung in verschiedenen Tumormodellen bei [213-217], so auch im Rahmen des adoptiven T-Zell-Transfers in einem B16.SIY Melanommodell. [218] Hier konnte gezeigt werden, dass die Tumorbekämpfung von der IFN – γ - Produktion adoptiv transferrierter CD4⁺ und CD8⁺ Zellen abhängig war. [218] Um herauszufinden, ob in unserem Versuchsmodell durch eine MDSC-Depletion die Induktion tumorspezifischer T-Zellen verbessert wird, betrachteten wir die tumorspezifische IFN- γ -Freisetzung von T-Zellen aus TVDLN. Wir konnten nachweisen, dass bereits eine einmalige Kombinationsbehandlung, bestehend aus Lymphodepletion und aktiv-spezifischer Vakzinierung (LRAST), die tumorspezifische IFN – γ - Produktion von T-Zellen aus TVDLN erhöht. Im Vergleich zur IFN – γ - Sekretion der Lymphknotenzellen der mit LRAST + Isotyp behandelten Mäuse war die tumorspezifische Freisetzung in der Behandlungsgruppe LRAST + RB6-8C5 mit durchschnittlich ca. 8000 pg/ml um ein vielfaches gesteigert. Aufgrund der Streuung der ermittelten Einzelwerte war der Unterschied jedoch nicht signifikant.

Da durch die Depletion von MDSC die tumorspezifische Effektorfunktion, beziehungsweise der Anteil tumorspezifischer T-Zellen, gemessen an der tumorspezifischen IFN – γ – Freisetzung, gesteigert werden konnte, stellte sich die Frage, ob die MDSC-Depletion

auch *in vivo* das Wachstumsverhalten der D5-Tumore nach aktiv-spezifischer Immunisierung beeinflusst. Eine Hemmung des Tumorwachstums und sogar eine Verkleinerung etablierter Tumore durch Anwendung von anti-Gr-1 mAk (RB6-8C5) wurde schon mehrfach in murinen Tumormodellen gezeigt. [200-202] Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Srivastava *et al.* und Zhang *et al.*, die unter repetitiver Verabreichung der anti-Gr-1 Depletionsantikörper einen dauerhaft hemmenden Einfluss auf das Tumorwachstum sahen, unterschied sich in unseren Versuchen die Tumorgröße von LRAST + RB6-8C5 behandelten Mäusen im Vergleich zur Gruppe LRAST + Isotyp ab dem 12. Tag nach Beginn der Behandlung (15 Tage nach Tumorinokulation) nicht signifikant voneinander. Nur in der initialen Phase (7, 9, 11 und 13 Tage nach Tumorinokulation) fanden wir signifikant kleinere Tumore in Mäusen mit der Kombinationsbehandlung LRAST + RB6-8C5. Obwohl ab Tag 4 bereits zunehmend Sekundärantikörper-beladene MDSC nachzuweisen waren, scheint die signifikante Reduktion der PMN-MDSC innerhalb der ersten zwei Wochen mit einer erfolgreichen Verbesserung der Antigenpräsentation und einem verbesserten Priming zytotoxischer T-Zellen einherzugehen.

Condamine *et al.* zeigten, dass eine einmalige i.p. Anwendung des RB6-8C5 Antikörpers bei Versuchstieren zu einer Splenomegalie führt und neun Tage nach Applikation der Antikörper mit signifikant erhöhten Zellzahlen von PMN- und M-MDSC assoziiert ist. [199] Auch in unseren Versuchen wiesen die Versuchstiere deutlich vergrößerte Milzen nach LRAST + RB6-8C5 auf. Es wird vermutet, dass die verkürzte Lebensdauer der MDSC einen proliferativen Reiz auf ihre Vorstufen im Knochenmark bewirkt und eine periphere Expansion erzeugt. [199] Eine prozentuale Zunahme myeloider Zellen im Knochenmark und das Ausbleiben einer dortigen depletierenden Wirkung, wurde auch von Ribechini *et al.* nach einmaliger i.p. Gabe der anti-Gr-1 mAb festgestellt. [204] Und auch Moses *et al.* konnten feststellen, dass neutrophile Granulozyten, die mit PMN-MDSC die Zellmarker CD11b und Ly6G teilen, durch Anwendung von anti-Gr-1 mAk (Klon RB6-8C5) organübergreifend und insbesondere in peripherem Blut depletiert werden können. [209] In der Milz und im Tumor des murinen HNC-Modells fanden sich jedoch depletionsresistente Zellen und eine extramedulläre Granulopoese führte in tumortragenden Tieren (im Gegensatz zu tumorfreien Mäusen) zu einer Wiederkehr von unreifen CD11b⁺ Ly6G⁺ Zellen mit immunmodulatorischen Eigenschaften, trotz fortlaufender anti-Gr-1 mAk Anwendung. [209] Anti-Gr-1 mAk erwiesen sich ferner als Aktivatoren von STAT1, STAT5 und insbesondere STAT3 und können so, analog zu GM-CSF als Aktivatoren myeloider Zelllinien fungieren und die Differenzierung zu MDSC, sowie deren Aktivierung vorantreiben. [204] Die STAT-Aktivierung wurde bereits von Serafini und Bronte als Grund für den MDSC-Rebound bei repetitiver RB6-8C5-Anwendung diskutiert. [219]

Das LRAST-Behandlungsschema in Kombination mit einer repetitiven Gabe des Depletionsantikörpers stellt also eine Kombination aus drei Komponenten dar, die trotz eines jeweils positiven Effektes der einzelnen Bestandteile auf die anti-Tumor Antwort, zusammen ins Gegenteil umschlagen können. Cyclophosphamid, das von den D5G6-Zellen sezernierte GM-CSF und die anti-Gr-1 mAk zusammen stellen möglicherweise einen kumulativen Reiz zur Proliferation und Aktivierung myeloider Suppressorzellen dar. Dies könnte unter Anderem ein Grund für die im Verlauf fehlende Wirksamkeit der Behandlung gegen das Wachstum der D5-Tumore sein. Für den Wiederanstieg der PMN-MDSC lassen sich zusammenfassend drei Erklärungen finden. Eine verstärkte Rekrutierung aus dem Knochenmark, eine extramedulläre Granulopoese, die dem Depletionsdruck geschuldet ist [209] und die Bildung von PMN-MDSC aus M-MDSC, was von Youn *et al.* in [220] ausführlich diskutiert wurde. Obwohl also die Zunahme der PMN-MDSC trotz Gabe der anti-Gr-1 mAk durch Neubildung und das Auftreten einer Depletionsresistenz erklärbar ist, bleibt letztlich ungeklärt, wieso in unseren Versuchen zum letzten Messzeitpunkt (Tag 24) keine RB6-8C5-Antikörperbindung mehr nachweisbar war.

In einer Arbeit von Matsuzaki *et al.* wurde gezeigt, dass auch Gr-1⁺ CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen (CD8⁺ CD44^{high}) nach polyklonaler Aktivierung mit anti-CD3 Ak oder einer Kombination aus anti-CD3 Ak und IL-2 Stimulation rasch zu potenten IFN- γ -produzierenden Zellen ausdifferenzieren können und dadurch eine wichtige Rolle als zytotoxische Effektoren in der anti-Tumor Immunität einnehmen. Dies wurde am murinen Modell des MBL-2 T-Zell-Lymphoms nach Lymphodepletion mit Cyclophosphamid und einem adoptiven Transfer von Milzzellen aus MBL-2 immunisierten Mäusen untersucht. [205] Durch Anwendung von anti-Gr-1 mAk (RB6-8C5) wurden Gr-1⁺ CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen erfolgreich depletiert, sodass der adoptive Milzzelltransfer aus Mäusen nach RB6-8C5-Behandlung in einer reduzierten anti-Tumor Wirkung resultierte. Ein Milzzelltransfer aus Mäusen, die zuvor mit Kontrollantikörpern behandelt wurden, führte zusammen mit einer Cyclophosphamidbehandlung hingegen zur kompletten Tumoregression. [205, 221] Wir bestätigten auch in unserem Tumormodell die Gr-1-Expression auf CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen, sowie das Fehlen dieser auf CD4⁺ Gedächtnis-T-Zellen (Daten nicht gezeigt). Wir konnten ferner nachweisen, dass es zu einer Bindung der RB6-8C5 mAk an Zentral- und Effektor-CD8⁺-Gedächtnis-T-Zellen kommt und dass die Frequenz dieser Zellen nach Anwendung des Depletionsantikörpers im Blut reduziert wird. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Matsuzaki *et al.* scheint es auch in der vorliegenden Arbeit möglich, dass die zu Anfang beobachtete Verzögerung des Tumorwachstums in der Behandlungsgruppe LRAST + RB6-8C5 durch die Depletion von CD8⁺-Gedächtniszellen im Verlauf nicht aufrechterhalten werden kann.

Trotzdem ist festzuhalten, dass innerhalb des Pools rekonstituierter Zellen eine deutliche Ausprägung von T-Zellmarkern beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt). Während also die transferierten CD45.1⁺ Milzzellen keinen Beitrag zur Dynamik der myeloiden Zellen nach LRAST lieferten, ist der im Zeitverlauf tendenziell zunehmende Anteil der CD45.1⁺ Zellen an den wirtseigenen Leukozyten vermutlich mit einer Ausweitung im T-Zellkompartiment assoziiert. Die Aufklärung des Beitrages der rekonstituierten T-Zellen, vor allem als unmittelbare tumorspezifische Effektorzellen, aber auch als Gedächtniszellen, und ihre Interaktion mit myeloiden Suppressorzellen stellt für zukünftige Versuche spannende Fragen bereit.

6. Zusammenfassung

Die Vakzinierung mit autologen Tumorzellen ermöglicht die Bereitstellung aller zur Verfügung stehenden Tumorantigene, die im Rahmen einer Immunaktivierung gegen den Tumor als Zielstrukturen genutzt werden können. [222] Hierdurch sollen tumorspezifische T-Zellen induziert werden, die gegen etablierte Tumore wirken. Durch Immundepletion [223, 224] und die nachfolgende Rekonstitution mit naiven T-Zellen, sowie durch Transfektion der zur Vakzinierung verwendeten Tumorzellen mit dem Zytokin GM-CSF [136, 152, 155] kann die Frequenz tumorspezifischer Zellen und deren therapeutische Effektivität gesteigert werden. [152, 224] Allerdings wird durch MDSC die Induktion tumorspezifischer T-Zellen und deren therapeutische Effektivität gehemmt. [51, 69, 164, 225]

Anhand des bereits etablierten Immuntherapiekonzepts (LRAST), welches mit einer Lymphodepletion, der Immunrekonstitution und einer aktiv-spezifischen Tumorstimmung die oben genannten Therapiebestandteile enthält, untersuchten wir die Bedeutung von MDSC für die Induktion und Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen am Modell des D5-Melanoms.

Nach LRAST-Behandlung nahm die Frequenz polymorphonukleärer (PMN-) und monozytärer (M-) MDSC in Milz und Blut zu. Dabei konnte zwischenzeitlich ein sprunghafter Frequenzanstieg der MDSC im peripheren Blut und in der Milz beobachtet und auch eine Tumordinfiltration der immunsuppressiven Zellen nachgewiesen werden. Diese MDSC entstammten dem Wirtstier und wurden nicht im Rahmen des Milzzelltransfers zur Immunrekonstitution übertragen. Intravenös transferierte MDSC stellten keinen relevanten Anteil der MDSC-Gesamtpopulation dar und wiesen keine Dynamik im Verlauf der Behandlung auf. Eine repetitive Depletion der MDSC mit anti-Gr-1 monoklonalen Antikörpern, die ergänzend zu LRAST appliziert wurden, wirkte sich insbesondere auf die Frequenz von PMN-MDSC aus. Die Effektorfunktion tumorspezifischer T-Zellen, gemessen an der tumorspezifischen IFN- γ -Freisetzung aus TVDLN, konnte durch die Depletion von PMN-MDSC im Vergleich zum Therapieschema ohne MDSC-Depletion gesteigert werden. Dies ging mit einer anfänglichen signifikanten Verzögerung des Tumorwachstums etablierter s.c. Tumore einher. Auf lange Sicht konnte die Immuntoleranz gegenüber der Erkrankung allerdings nicht durchbrochen werden. Weder durch LRAST alleine, noch durch eine ergänzende MDSC-Depletion konnte das Tumorwachstum langfristig verhindert oder signifikant gehemmt werden.

7. Ausblick

In der wissenschaftlichen Literatur findet sich ausreichend Evidenz dafür, dass MDSC das Auswachsen von Tumoren fördern. Zusammenfassend unterstreichen auch unsere Daten die wichtige negativ-immunregulierende Funktion myeloider Suppressorzellen im murinen Melanommodell. Daher liegt es nahe, diese im Rahmen der immunologischen Kombinationstherapie gezielt zu beeinflussen. Dies wurde bereits in präklinischen Ansätzen mehrfach und durch Verwendung verschiedener Substanzen, darunter all-trans-Retinsäure (*All-Trans Retinoic Acid*, ATRA), Chemotherapeutika wie 5-Fluorouracil und Gemcitabin, STAT3 – Inhibitoren oder Chemokin – (Rezeptor -) Antagonisten unternommen. [225] Auch der Schritt der Translation in klinische Studien ist bereits erfolgt. Bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren und malignem Melanom konnte die Anzahl und Funktion von MDSC, durch Anwendung des Phosphodiesterase-5-Inhibitors Tadalafil beeinflusst und die tumorspezifische Immunantwort der Krebspatienten verbessert werden. [226-228] Weitere Studien an Patienten mit einem malignen Melanom (Ipilimumab + ATRA; Pembrolizumab + SX-682; Ipilimumab, Nivolumab + Omaveloxolone (RTA-408)² [229]), und anderen Tumoren, wie dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (Nivolumab + Gemcitabine), untersuchen die Kombination aus Immuncheckpoint-Blockade und Substanzen, welche die MDSC, ihre Rekrutierung oder ihre immunsuppressiven Mechanismen gezielt beeinflussen. [69, 225]

Kürzlich konnte mit dem *Lectin-type oxidized LDL receptor 1* (LOX-1) ein neuer Marker humaner PMN-MDSC identifiziert und seine Bedeutung in verschiedenen Krebsentitäten, wie beispielsweise dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom, dem Kolonkarzinom (Adenokarzinom), Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs und dem hepatozellulären Karzinom herausgearbeitet werden. [230, 231] Auch hier bietet sich möglicherweise ein Ansatzpunkt MDSC in der Krebstherapie gezielt anzugreifen und das Überleben der Patienten zu verlängern.

Nicht zuletzt gibt es auch andere wichtige Negativregulatoren der Immunantwort auf Tumore, wie beispielsweise Treg, die in der Tumorthherapie, ebenso wie MDSC, gezielt beeinflusst werden können und im Rahmen von Immuntherapien berücksichtigt werden sollten. [218, 232, 233]

Die Vielfalt potentieller Immun-Therapiestrategien für die Behandlung von Patienten mit malignen Erkrankungen gibt Anlass zur Hoffnung, dass in Zukunft ein besseres Überleben der Patienten möglich sein wird.

² SX-682: C-X-C-Motiv Chemokinrezeptor 1/2 (CXCR1/2) Antagonist; RTA-408 (Omaveloxolone): semisynthetisches Triterpenoid mit antioxidativen Eigenschaften.

8. Referenzen

1. Rudolph, P. and C. Schubert, *Pathologie*. Melanozytäre Läsionen. 2009, Berlin Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
2. Mancuso, P., et al., *Thymine DNA glycosylase as a novel target for melanoma*. *Oncogene*, 2019.
3. Mahadevan, A., V.L. Patel, and N. Dagoglu, *Radiation Therapy in the Management of Malignant Melanoma*. *Oncology (Williston Park)*, 2015. **29**(10): p. 743-51.
4. Mashima, E., et al., *Nivolumab in the treatment of malignant melanoma: review of the literature*. *Onco Targets Ther*, 2015. **8**: p. 2045-51.
5. Bender, C., J.C. Hassel, and A. Enk, *Immunotherapy of Melanoma*. *Oncol Res Treat*, 2016. **39**(6): p. 369-76.
6. Lo, J.A. and D.E. Fisher, *The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics*. *Science*, 2014. **346**(6212): p. 945-9.
7. Umansky, V., et al., *Myeloid-derived suppressor cells in malignant melanoma*. *J Dtsch Dermatol Ges*, 2014. **12**(11): p. 1021-7.
8. Schilling, B. and A. Paschen, *Immunological consequences of selective BRAF inhibitors in malignant melanoma: Neutralization of myeloid-derived suppressor cells*. *Oncoimmunology*, 2013. **2**(8): p. e25218.
9. Umansky, V. and A. Sevko, *Melanoma-induced immunosuppression and its neutralization*. *Semin Cancer Biol*, 2012. **22**(4): p. 319-26.
10. Lenzen-Schulte, M.G., Dustin, *Nobelpreis für Medizin: Lahme Abwehr scharf machen*. *Dtsch Arztebl International*, 2018. **115**(40).
11. Tuettenberg, A., et al., *Dendritic cell-based immunotherapy of malignant melanoma: success and limitations*. *J Dtsch Dermatol Ges*, 2007. **5**(3): p. 190-6.
12. Grenier, J.M., S.T. Yeung, and K.M. Khanna, *Combination Immunotherapy: Taking Cancer Vaccines to the Next Level*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 610.
13. *Immune system*. 2019 14.02.2019]; Available from: <https://www.nature.com/subjects/immune-system>.
14. Welsch, U., *Lehrbuch Histologie*. 260-289. Vol. 2. 2006, München: Elsevier GmbH, München.
15. Speckmann, E.-J., J. Hescheler, and R. Köhling, *Physiologie*. Abwehr und Immunität. Vol. 5. 2008, München, Jena: Elsevier GmbH, München.
16. Lapp, T., et al., *[Old immune system- new information? Importance of mononuclear phagocytes in corneal allograft rejection]*. *Ophthalmologe*, 2012. **109**(9): p. 869-78.
17. Parkin, J. and B. Cohen, *An overview of the immune system*. *Lancet*, 2001. **357**(9270): p. 1777-89.
18. Delves, P.J. and I.M. Roitt, *The Immune System*. *New England Journal of Medicine*, 2000. **343**(1): p. 37-49.
19. Fauci, A., et al., *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 2008: McGraw-Hill Publishing.
20. LeBien, T.W. and T.F. Tedder, *B lymphocytes: how they develop and function*. *Blood*, 2008. **112**(5): p. 1570-80.
21. Schuster, M., A. Nechansky, and R. Kircheis, *Cancer immunotherapy*. *Biotechnol J*, 2006. **1**(2): p. 138-47.
22. Davis, I.D., *An overview of cancer immunotherapy*. *Immunol Cell Biol*, 2000. **78**(3): p. 179-95.
23. Coley, W.B., *The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases*. 1893. *Clin Orthop Relat Res*, 1991(262): p. 3-11.
24. Starnes, C.O., *Coley's toxins in perspective*. *Nature*, 1992. **357**(6373): p. 11-2.
25. Schreiber, R.D., L.J. Old, and M.J. Smyth, *Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion*. *Science*, 2011. **331**(6024): p. 1565-70.
26. Burnet, M., *Cancer; a biological approach. I. The processes of control*. *Br Med J*, 1957. **1**(5022): p. 779-86.
27. Thomas, L. 1959, New York: Hoeber-Harper.

28. Old, L.J. and E.A. Boyse, *Immunology of Experimental Tumors*. Annu Rev Med, 1964. **15**: p. 167-86.
29. Sims, G.P., et al., *HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 367-88.
30. Diefenbach, A., et al., *Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity*. Nature, 2001. **413**(6852): p. 165-71.
31. Mittal, D., et al., *New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape*. Curr Opin Immunol, 2014. **27**: p. 16-25.
32. O'Callaghan, C.A., et al., *Molecular competition for NKG2D: H60 and RAE1 compete unequally for NKG2D with dominance of H60*. Immunity, 2001. **15**(2): p. 201-11.
33. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 991-8.
34. Kotredes, K.P. and A.M. Gamero, *Interferons as inducers of apoptosis in malignant cells*. J Interferon Cytokine Res, 2013. **33**(4): p. 162-70.
35. Bromberg, J.F., et al., *Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(15): p. 7673-8.
36. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The three Es of cancer immunoediting*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 329-60.
37. Smyth, M.J., G.P. Dunn, and R.D. Schreiber, *Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity*. Adv Immunol, 2006. **90**: p. 1-50.
38. Wang, M., et al., *Role of tumor microenvironment in tumorigenesis*. J Cancer, 2017. **8**(5): p. 761-773.
39. Del Prete, A., et al., *Leukocyte trafficking in tumor microenvironment*. Curr Opin Pharmacol, 2017. **35**: p. 40-47.
40. Chen, F., et al., *New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities*. BMC Med, 2015. **13**: p. 45.
41. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
42. Hanahan, D. and L.M. Coussens, *Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment*. Cancer Cell, 2012. **21**(3): p. 309-22.
43. Rhim, A.D., et al., *Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma*. Cancer Cell, 2014. **25**(6): p. 735-47.
44. Wu, T. and Y. Dai, *Tumor microenvironment and therapeutic response*. Cancer Lett, 2017. **387**: p. 61-68.
45. Lanca, T. and B. Silva-Santos, *The split nature of tumor-infiltrating leukocytes: Implications for cancer surveillance and immunotherapy*. Oncoimmunology, 2012. **1**(5): p. 717-725.
46. Fridman, W.H., et al., *The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 298-306.
47. Giraldo, N.A., et al., *Orchestration and Prognostic Significance of Immune Checkpoints in the Microenvironment of Primary and Metastatic Renal Cell Cancer*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(13): p. 3031-40.
48. Mellman, I., G. Coukos, and G. Dranoff, *Cancer immunotherapy comes of age*. Nature, 2011. **480**(7378): p. 480-9.
49. Ostrand-Rosenberg, S. and C. Fenselau, *Myeloid-Derived Suppressor Cells: Immune-Suppressive Cells That Impair Antitumor Immunity and Are Sculpted by Their Environment*. J Immunol, 2018. **200**(2): p. 422-431.
50. Youn, J.I. and D.I. Gabrilovich, *The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity*. Eur J Immunol, 2010. **40**(11): p. 2969-75.
51. Monu, N.R. and A.B. Frey, *Myeloid-derived suppressor cells and anti-tumor T cells: a complex relationship*. Immunol Invest, 2012. **41**(6-7): p. 595-613.

52. Qu, P., K.C. Boelte, and P.C. Lin, *Negative regulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer*. Immunol Invest, 2012. **41**(6-7): p. 562-80.
53. Gabrilovich, D.I. and S. Nagaraj, *Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(3): p. 162-74.
54. Gabrilovich, D.I., et al., *The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells*. Cancer Res, 2007. **67**(1): p. 425; author reply 426.
55. Dolcetti, L., et al., *Myeloid-derived suppressor cell role in tumor-related inflammation*. Cancer Lett, 2008. **267**(2): p. 216-25.
56. Serafini, P., I. Borrello, and V. Bronte, *Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression*. Semin Cancer Biol, 2006. **16**(1): p. 53-65.
57. Condamine, T. and D.I. Gabrilovich, *Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function*. Trends Immunol, 2011. **32**(1): p. 19-25.
58. Dai, J., et al., *Myeloid-derived suppressor cells: paradoxical roles in infection and immunity*. J Innate Immun, 2015. **7**(2): p. 116-26.
59. Bronte, V., et al., *Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells*. Blood, 2000. **96**(12): p. 3838-46.
60. Kusmartsev, S. and D.I. Gabrilovich, *Inhibition of myeloid cell differentiation in cancer: the role of reactive oxygen species*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(2): p. 186-96.
61. Melani, C., et al., *Myeloid cell expansion elicited by the progression of spontaneous mammary carcinomas in c-erbB-2 transgenic BALB/c mice suppresses immune reactivity*. Blood, 2003. **102**(6): p. 2138-45.
62. Youn, J.I., et al., *Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice*. J Immunol, 2008. **181**(8): p. 5791-802.
63. Movahedi, K., et al., *Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity*. Blood, 2008. **111**(8): p. 4233-44.
64. Youn, J.I., et al., *Characterization of the nature of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice*. J Leukoc Biol, 2012. **91**(1): p. 167-81.
65. Dilek, N., et al., *Myeloid-derived suppressor cells: mechanisms of action and recent advances in their role in transplant tolerance*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 208.
66. Gabrilovich, D.I., et al., *Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells*. J Immunol, 2001. **166**(9): p. 5398-406.
67. Dingar, D., et al., *MYC dephosphorylation by the PP1/PNUTS phosphatase complex regulates chromatin binding and protein stability*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 3502.
68. de Haas, N., et al., *Improving cancer immunotherapy by targeting the STATE of MDSCs*. Oncoimmunology, 2016. **5**(7): p. e1196312.
69. Weber, R., et al., *Myeloid-Derived Suppressor Cells Hinder the Anti-Cancer Activity of Immune Checkpoint Inhibitors*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1310.
70. Ostrand-Rosenberg, S., L.A. Horn, and S.T. Haile, *The programmed death-1 immune-suppressive pathway: barrier to antitumor immunity*. J Immunol, 2014. **193**(8): p. 3835-41.
71. Platten, M., W. Wick, and B.J. Van den Eynde, *Tryptophan catabolism in cancer: beyond IDO and tryptophan depletion*. Cancer Res, 2012. **72**(21): p. 5435-40.
72. Munn, D.H., et al., *GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase*. Immunity, 2005. **22**(5): p. 633-42.
73. Pan, P.Y., et al., *Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer*. Cancer Res, 2010. **70**(1): p. 99-108.
74. Stiff, A., et al., *Nitric Oxide Production by Myeloid-Derived Suppressor Cells Plays a Role in Impairing Fc Receptor-Mediated Natural Killer Cell Function*. Clin Cancer Res, 2018. **24**(8): p. 1891-1904.
75. Sceneay, J., et al., *Hypoxia-driven immunosuppression contributes to the pre-metastatic niche*. Oncoimmunology, 2013. **2**(1): p. e22355.

76. Yang, L., et al., *Expansion of myeloid immune suppressor Gr⁺CD11b⁺ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis*. Cancer Cell, 2004. **6**(4): p. 409-21.
77. Srivastava, M.K., et al., *Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine*. Cancer Res, 2010. **70**(1): p. 68-77.
78. Ostrand-Rosenberg, S., *Myeloid-derived suppressor cells: more mechanisms for inhibiting antitumor immunity*. Cancer Immunol Immunother, 2010. **59**(10): p. 1593-600.
79. Hanson, E.M., et al., *Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4⁺ and CD8⁺ T cells*. J Immunol, 2009. **183**(2): p. 937-44.
80. Lindau, D., et al., *The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells*. Immunology, 2013. **138**(2): p. 105-15.
81. Gabrilovich, D.I., S. Ostrand-Rosenberg, and V. Bronte, *Coordinated regulation of myeloid cells by tumours*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(4): p. 253-68.
82. Lu, C., et al., *The expression profiles and regulation of PD-L1 in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells*. Oncoimmunology, 2016. **5**(12): p. e1247135.
83. Ballbach, M., et al., *Expression of checkpoint molecules on myeloid-derived suppressor cells*. Immunol Lett, 2017. **192**: p. 1-6.
84. Molon, B., et al., *Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells*. J Exp Med, 2011. **208**(10): p. 1949-62.
85. Fallarino, F., et al., *The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells*. J Immunol, 2006. **176**(11): p. 6752-61.
86. Marvel, D. and D.I. Gabrilovich, *Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected*. J Clin Invest, 2015. **125**(9): p. 3356-64.
87. Obermajer, N., et al., *Positive feedback between PGE2 and COX2 redirects the differentiation of human dendritic cells toward stable myeloid-derived suppressor cells*. Blood, 2011. **118**(20): p. 5498-505.
88. Ostrand-Rosenberg, S. and P. Sinha, *Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer*. J Immunol, 2009. **182**(8): p. 4499-506.
89. Eruslanov, E., et al., *Pivotal Advance: Tumor-mediated induction of myeloid-derived suppressor cells and M2-polarized macrophages by altering intracellular PGE(2) catabolism in myeloid cells*. J Leukoc Biol, 2010. **88**(5): p. 839-48.
90. Umansky, V., et al., *The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) in Cancer Progression*. Vaccines (Basel), 2016. **4**(4).
91. Foell, D., et al., *S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(1): p. 28-37.
92. Kumar, V., et al., *The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment*. Trends Immunol, 2016. **37**(3): p. 208-220.
93. Melero-Jerez, C., et al., *Myeloid derived suppressor cells in inflammatory conditions of the central nervous system*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1862**(3): p. 368-80.
94. Chalmin, F., et al., *Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells*. J Clin Invest, 2010. **120**(2): p. 457-71.
95. Bunt, S.K., et al., *Inflammation enhances myeloid-derived suppressor cell cross-talk by signaling through Toll-like receptor 4*. J Leukoc Biol, 2009. **85**(6): p. 996-1004.
96. Guery, L. and S. Hugues, *Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 314620.
97. Nalbant, A., *IL-17, IL-21, and IL-22 Cytokines of T Helper 17 Cells in Cancer*. J Interferon Cytokine Res, 2018.
98. Qian, X., et al., *Interleukin-17 acts as double-edged sword in anti-tumor immunity and tumorigenesis*. Cytokine, 2017. **89**: p. 34-44.
99. Ortiz, M.L., et al., *Immature myeloid cells directly contribute to skin tumor development by recruiting IL-17-producing CD4⁺ T cells*. J Exp Med, 2015. **212**(3): p. 351-67.

100. Greijer, A.E. and E. van der Wall, *The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis*. J Clin Pathol, 2004. **57**(10): p. 1009-14.
101. Ravetch, J.V. and L.L. Lanier, *Immune inhibitory receptors*. Science, 2000. **290**(5489): p. 84-9.
102. Gabrilovich, D., *Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(12): p. 941-52.
103. Mellor, A.L. and D.H. Munn, *IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(10): p. 762-74.
104. Serafini, P., et al., *Derangement of immune responses by myeloid suppressor cells*. Cancer Immunol Immunother, 2004. **53**(2): p. 64-72.
105. Mannick, J.B., et al., *Fas-induced caspase denitrosylation*. Science, 1999. **284**(5414): p. 651-4.
106. Saio, M., et al., *Tumor-infiltrating macrophages induce apoptosis in activated CD8(+) T cells by a mechanism requiring cell contact and mediated by both the cell-associated form of TNF and nitric oxide*. J Immunol, 2001. **167**(10): p. 5583-93.
107. Huang, B., et al., *Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host*. Cancer Res, 2006. **66**(2): p. 1123-31.
108. Serafini, P., et al., *Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells*. Cancer Res, 2008. **68**(13): p. 5439-49.
109. Toh, B., et al., *Mesenchymal transition and dissemination of cancer cells is driven by myeloid-derived suppressor cells infiltrating the primary tumor*. PLoS Biol, 2011. **9**(9): p. e1001162.
110. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 442-54.
111. Rodriguez, P.C., et al., *Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine*. J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 21123-9.
112. Rodriguez, P.C., D.G. Quiceno, and A.C. Ochoa, *L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression*. Blood, 2007. **109**(4): p. 1568-73.
113. Bingisser, R.M., et al., *Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway*. J Immunol, 1998. **160**(12): p. 5729-34.
114. Brito, C., et al., *Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death*. J Immunol, 1999. **162**(6): p. 3356-66.
115. Bronte, V., et al., *IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice*. J Immunol, 2003. **170**(1): p. 270-8.
116. Bronte, V. and P. Zanovello, *Regulation of immune responses by L-arginine metabolism*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(8): p. 641-54.
117. Gallina, G., et al., *Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells*. J Clin Invest, 2006. **116**(10): p. 2777-90.
118. Kirkwood, J.M., et al., *Immunotherapy of cancer in 2012*. CA Cancer J Clin, 2012. **62**(5): p. 309-35.
119. Nowak, A.K., R.A. Lake, and B.W. Robinson, *Combined chemoimmunotherapy of solid tumours: improving vaccines?* Adv Drug Deliv Rev, 2006. **58**(8): p. 975-90.
120. Baxevanis, C.N., S.A. Perez, and M. Papamichail, *Combinatorial treatments including vaccines, chemotherapy and monoclonal antibodies for cancer therapy*. Cancer Immunol Immunother, 2009. **58**(3): p. 317-24.
121. Coulie, P.G., et al., *Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(2): p. 135-46.
122. Ogata, K., et al., *Clinical significance of melanoma antigen-encoding gene-1 (MAGE-1) expression and its correlation with poor prognosis in differentiated advanced gastric cancer*. Ann Surg Oncol, 2011. **18**(4): p. 1195-203.
123. Klebanoff, C.A., L. Gattinoni, and N.P. Restifo, *CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy*. Immunol Rev, 2006. **211**: p. 214-24.
124. Reading, J.L., et al., *The function and dysfunction of memory CD8(+) T cells in tumor immunity*. Immunol Rev, 2018. **283**(1): p. 194-212.

125. Palucka, A.K. and L.M. Coussens, *The Basis of Oncoimmunology*. Cell, 2016. **164**(6): p. 1233-47.
126. Pardoll, D.M., *The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 252-64.
127. Eggermont, A.M.M., et al., *Adjuvant Pembrolizumab versus Placebo in Resected Stage III Melanoma*. N Engl J Med, 2018. **378**(19): p. 1789-1801.
128. Palucka, K., J. Banchereau, and I. Mellman, *Designing vaccines based on biology of human dendritic cell subsets*. Immunity, 2010. **33**(4): p. 464-78.
129. Lollini, P.L., et al., *The Promise of Preventive Cancer Vaccines*. Vaccines (Basel), 2015. **3**(2): p. 467-89.
130. Zeng, Y., et al., *Induction of BCR-ABL-specific immunity following vaccination with chaperone-rich cell lysates derived from BCR-ABL+ tumor cells*. Blood, 2005. **105**(5): p. 2016-22.
131. Pardoll, D.M., *Paracrine cytokine adjuvants in cancer immunotherapy*. Annu Rev Immunol, 1995. **13**: p. 399-415.
132. Gershanovich, M.L., *[Use of interleukin-2 (proleukin, aldesleukin) in oncological practice]*. Vopr Onkol, 2003. **49**(6): p. 776-82.
133. Hurley, K.E. and P.B. Chapman, *Helping melanoma patients decide whether to choose adjuvant high-dose interferon-alpha2b*. Oncologist, 2005. **10**(9): p. 739-42.
134. Kempf, R.A., et al., *Recombinant interferon alpha-2 (INTRON A) in a phase II study of renal cell carcinoma*. J Biol Response Mod, 1986. **5**(1): p. 27-35.
135. Yang, J.C., et al., *Randomized study of high-dose and low-dose interleukin-2 in patients with metastatic renal cancer*. J Clin Oncol, 2003. **21**(16): p. 3127-32.
136. Dranoff, G., et al., *Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(8): p. 3539-43.
137. Fearon, E.R., et al., *Interleukin-2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor response*. Cell, 1990. **60**(3): p. 397-403.
138. Kayaga, J., et al., *Anti-tumour activity against B16-F10 melanoma with a GM-CSF secreting allogeneic tumour cell vaccine*. Gene Ther, 1999. **6**(8): p. 1475-81.
139. Kircheis, R., et al., *Interleukin-2 gene-modified allogeneic melanoma cell vaccines can induce cross-protection against syngeneic tumors in mice*. Cancer Gene Ther, 2000. **7**(6): p. 870-8.
140. Kircheis, R., et al., *Cytokine gene-modified tumor cells for prophylactic and therapeutic vaccination: IL-2, IFN-gamma, or combination IL-2 + IFN-gamma*. Cytokines Cell Mol Ther, 1998. **4**(2): p. 95-103.
141. Scott, A.M., J.D. Wolchok, and L.J. Old, *Antibody therapy of cancer*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 278-87.
142. Rayner, A.A., et al., *Lymphokine-activated killer (LAK) cells. Analysis of factors relevant to the immunotherapy of human cancer*. Cancer, 1985. **55**(6): p. 1327-33.
143. Schmidt-Wolf, I.G., et al., *Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity*. J Exp Med, 1991. **174**(1): p. 139-49.
144. Restifo, N.P., M.E. Dudley, and S.A. Rosenberg, *Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(4): p. 269-81.
145. Rosenberg, S.A., et al., *Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(13): p. 4550-7.
146. Lam, S.S., et al., *Advances in strategies and methodologies in cancer immunotherapy*. Discov Med, 2015. **19**(105): p. 293-301.
147. Zitvogel, L., et al., *Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines*. J Exp Med, 1996. **183**(1): p. 87-97.
148. van den Engel, N.K., et al., *Combination immunotherapy and active-specific tumor cell vaccination augments anti-cancer immunity in a mouse model of gastric cancer*. J Transl Med, 2011. **9**: p. 140.

149. Gattinoni, L., et al., *Adoptive immunotherapy for cancer: building on success*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(5): p. 383-93.
150. Sistigu, A., et al., *Immunomodulatory effects of cyclophosphamide and implementations for vaccine design*. Semin Immunopathol, 2011. **33**(4): p. 369-83.
151. Bracci, L., et al., *Cyclophosphamide enhances the antitumor efficacy of adoptively transferred immune cells through the induction of cytokine expression, B-cell and T-cell homeostatic proliferation, and specific tumor infiltration*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(2 Pt 1): p. 644-53.
152. Hu, H.M., et al., *Development of antitumor immune responses in reconstituted lymphopenic hosts*. Cancer Res, 2002. **62**(14): p. 3914-9.
153. Mach, N., et al., *Differences in dendritic cells stimulated in vivo by tumors engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or Flt3-ligand*. Cancer Res, 2000. **60**(12): p. 3239-46.
154. Simmons, A.D., et al., *GM-CSF-secreting cancer immunotherapies: preclinical analysis of the mechanism of action*. Cancer Immunol Immunother, 2007. **56**(10): p. 1653-65.
155. Dranoff, G., *GM-CSF-secreting melanoma vaccines*. Oncogene, 2003. **22**(20): p. 3188-92.
156. Chang, A.E., et al., *Immunogenetic therapy of human melanoma utilizing autologous tumor cells transduced to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*. Hum Gene Ther, 2000. **11**(6): p. 839-50.
157. Soiffer, R., et al., *Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(22): p. 13141-6.
158. Soiffer, R., et al., *Vaccination with irradiated, autologous melanoma cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by adenoviral-mediated gene transfer augments antitumor immunity in patients with metastatic melanoma*. J Clin Oncol, 2003. **21**(17): p. 3343-50.
159. Arca, M.J., et al., *Therapeutic efficacy of T cells derived from lymph nodes draining a poorly immunogenic tumor transduced to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*. Cancer Gene Ther, 1996. **3**(1): p. 39-47.
160. Grossman, Z. and W.E. Paul, *Self-tolerance: context dependent tuning of T cell antigen recognition*. Semin Immunol, 2000. **12**(3): p. 197-203; discussion 257-344.
161. Ghiringhelli, F., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative*. Eur J Immunol, 2004. **34**(2): p. 336-44.
162. Lutsiak, M.E., et al., *Inhibition of CD4(+)25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide*. Blood, 2005. **105**(7): p. 2862-8.
163. Salem, M.L., et al., *Defining the ability of cyclophosphamide preconditioning to enhance the antigen-specific CD8+ T-cell response to peptide vaccination: creation of a beneficial host microenvironment involving type I IFNs and myeloid cells*. J Immunother, 2007. **30**(1): p. 40-53.
164. Gabrilovich, D.I., *Myeloid-Derived Suppressor Cells*. Cancer Immunol Res, 2017. **5**(1): p. 3-8.
165. Winter, H., et al., *Immunotherapy of melanoma: a dichotomy in the requirement for IFN-gamma in vaccine-induced antitumor immunity versus adoptive immunotherapy*. J Immunol, 2001. **166**(12): p. 7370-80.
166. Bertram, J.S. and P. Janik, *Establishment of a cloned line of Lewis Lung Carcinoma cells adapted to cell culture*. Cancer Lett, 1980. **11**(1): p. 63-73.
167. Nockel, J., et al., *Characterization of gastric adenocarcinoma cell lines established from CEA424/SV40 T antigen-transgenic mice with or without a human CEA transgene*. BMC Cancer, 2006. **6**: p. 57.
168. Thompson, J., et al., *A transgenic mouse line that develops early-onset invasive gastric carcinoma provides a model for carcinoembryonic antigen-targeted tumor therapy*. Int J Cancer, 2000. **86**(6): p. 863-9.
169. Winter, H., et al., *Tumour-induced polarization of tumour vaccine-draining lymph node T cells to a type 1 cytokine profile predicts inherent strong immunogenicity of the tumour and*

- correlates with therapeutic efficacy in adoptive transfer studies*. Immunology, 2003. **108**(3): p. 409-19.
170. McCoy, J.P., Jr., *Basic principles of flow cytometry*. Hematol Oncol Clin North Am, 2002. **16**(2): p. 229-43.
 171. Sack, U., A. Tarnok, and G.H. Rothe, *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. 2007.
 172. Chapman, G.V., *Instrumentation for flow cytometry*. J Immunol Methods, 2000. **243**(1-2): p. 3-12.
 173. Perfetto, S.P., P.K. Chattopadhyay, and M. Roederer, *Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(8): p. 648-55.
 174. Biosciences, B. *Optical path configuration*. 2018 14.02.2019]; Available from: <https://www.bdbiosciences.com/in/instruments/facscalibur/features/index.jsp>.
 175. Gabriella Henel, P. and P. John L. Schmitz, *Basic Theory and Clinical Applications of Flow Cytometry*. LABMEDICINE, 2007. **38**(7): p. 428-436.
 176. Herzenberg, L.A., et al., *Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed*. Nat Immunol, 2006. **7**(7): p. 681-5.
 177. Roberts, A.D. and D.L. Woodland, *Cutting edge: effector memory CD8⁺ T cells play a prominent role in recall responses to secondary viral infection in the lung*. J Immunol, 2004. **172**(11): p. 6533-7.
 178. Dutt, S., et al., *CD8⁺CD44(hi) but not CD4⁺CD44(hi) memory T cells mediate potent graft antilymphoma activity without GVHD*. Blood, 2011. **117**(11): p. 3230-9.
 179. BioLegend. *Zombie Yellow™ Fixable Viability Kit*. [Technical data sheet] 2016 2016, June 13 14.02.2019]; Available from: <https://www.biolegend.com/en-us/global-elements/pdf-popup/zombie-yellow-fixable-viability-kit-8514?filename=Zombie%20Yellow%20Fixable%20Viability%20Kit.pdf&pdfgen=true>.
 180. Vermes, I., et al., *A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V*. J Immunol Methods, 1995. **184**(1): p. 39-51.
 181. Henry, C.M., E. Hollville, and S.J. Martin, *Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry*. Methods, 2013. **61**(2): p. 90-7.
 182. Fadok, V.A., et al., *The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes*. Cell Death Differ, 1998. **5**(7): p. 551-62.
 183. Zembruski, N.C., et al., *7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry*. Anal Biochem, 2012. **429**(1): p. 79-81.
 184. Schmid, I., C. Uittenbogaart, and B.D. Jamieson, *Live-cell assay for detection of apoptosis by dual-laser flow cytometry using Hoechst 33342 and 7-amino-actinomycin D*. Nat Protoc, 2007. **2**(1): p. 187-90.
 185. Luttmann, W., et al., *Der Experimentator - Immunologie*. Vol. 4. 2014.
 186. Arca, M.J., et al., *Diverse manifestations of tumorigenicity and immunogenicity displayed by the poorly immunogenic B16-BL6 melanoma transduced with cytokine genes*. Cancer Immunol Immunother, 1996. **42**(4): p. 237-45.
 187. Deguine, J., et al., *Intravital imaging reveals distinct dynamics for natural killer and CD8⁺ T cells during tumor regression*. Immunity, 2010. **33**(4): p. 632-44.
 188. Millrud, C.R., C. Bergenfelz, and K. Leandersson, *On the origin of myeloid-derived suppressor cells*. Oncotarget, 2017. **8**(2): p. 3649-3665.
 189. Salem, M.L., et al., *Kinetics of rebounding of lymphoid and myeloid cells in mouse peripheral blood, spleen and bone marrow after treatment with cyclophosphamide*. Cell Immunol, 2012. **276**(1-2): p. 67-74.
 190. Ding, Z.C., et al., *Immunosuppressive myeloid cells induced by chemotherapy attenuate antitumor CD4⁺ T-cell responses through the PD-1-PD-L1 axis*. Cancer Res, 2014. **74**(13): p. 3441-53.

191. Sevko, A., et al., *Cyclophosphamide promotes chronic inflammation-dependent immunosuppression and prevents antitumor response in melanoma*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(6): p. 1610-9.
192. Becker, J.C. and D. Schrama, *The dark side of cyclophosphamide: cyclophosphamide-mediated ablation of regulatory T cells*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(6): p. 1462-5.
193. Meyer, C., et al., *Chronic inflammation promotes myeloid-derived suppressor cell activation blocking antitumor immunity in transgenic mouse melanoma model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(41): p. 17111-6.
194. Bracci, L., et al., *Immune-based mechanisms of cytotoxic chemotherapy: implications for the design of novel and rationale-based combined treatments against cancer*. Cell Death Differ, 2014. **21**(1): p. 15-25.
195. Bronte, V., et al., *Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation*. J Immunol, 1999. **162**(10): p. 5728-37.
196. Serafini, P., et al., *High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells*. Cancer Res, 2004. **64**(17): p. 6337-43.
197. Veglia, F., M. Perego, and D. Gabrilovich, *Myeloid-derived suppressor cells coming of age*. Nat Immunol, 2018. **19**(2): p. 108-119.
198. Lesokhin, A.M., et al., *Monocytic CCR2(+) myeloid-derived suppressor cells promote immune escape by limiting activated CD8 T-cell infiltration into the tumor microenvironment*. Cancer Res, 2012. **72**(4): p. 876-86.
199. Condamine, T., et al., *ER stress regulates myeloid-derived suppressor cell fate through TRAIL-R-mediated apoptosis*. J Clin Invest, 2014. **124**(6): p. 2626-39.
200. Hurez, V., et al., *Mitigating age-related immune dysfunction heightens the efficacy of tumor immunotherapy in aged mice*. Cancer Res, 2012. **72**(8): p. 2089-99.
201. Srivastava, M.K., et al., *Myeloid suppressor cell depletion augments antitumor activity in lung cancer*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e40677.
202. Zhang, Y., et al., *Fas signal promotes lung cancer growth by recruiting myeloid-derived suppressor cells via cancer cell-derived PGE2*. J Immunol, 2009. **182**(6): p. 3801-8.
203. Ma, C. and T.F. Greten, *Editorial: "Invisible" MDSC in tumor-bearing individuals after antibody depletion: fact or fiction?* J Leukoc Biol, 2016. **99**(6): p. 794.
204. Ribechini, E., P.J. Leenen, and M.B. Lutz, *Gr-1 antibody induces STAT signaling, macrophage marker expression and abrogation of myeloid-derived suppressor cell activity in BM cells*. Eur J Immunol, 2009. **39**(12): p. 3538-51.
205. Matsuzaki, J., et al., *Successful elimination of memory-type CD8+ T cell subsets by the administration of anti-Gr-1 monoclonal antibody in vivo*. Cell Immunol, 2003. **224**(2): p. 98-105.
206. Ma, C., et al., *Anti-Gr-1 antibody depletion fails to eliminate hepatic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice*. J Leukoc Biol, 2012. **92**(6): p. 1199-206.
207. Morales, J.K., et al., *Adoptive transfer of HER2/neu-specific T cells expanded with alternating gamma chain cytokines mediate tumor regression when combined with the depletion of myeloid-derived suppressor cells*. Cancer Immunol Immunother, 2009. **58**(6): p. 941-53.
208. Kumar, V., et al., *CD45 Phosphatase Inhibits STAT3 Transcription Factor Activity in Myeloid Cells and Promotes Tumor-Associated Macrophage Differentiation*. Immunity, 2016. **44**(2): p. 303-15.
209. Moses, K., et al., *Survival of residual neutrophils and accelerated myelopoiesis limit the efficacy of antibody-mediated depletion of Ly-6G+ cells in tumor-bearing mice*. J Leukoc Biol, 2016. **99**(6): p. 811-23.
210. Bhat, P., et al., *Interferon-gamma derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity*. Cell Death Dis, 2017. **8**(6): p. e2836.
211. Gerber, S.A., et al., *IFN-gamma mediates the antitumor effects of radiation therapy in a murine colon tumor*. Am J Pathol, 2013. **182**(6): p. 2345-54.

212. Lee, S. and K. Margolin, *Cytokines in cancer immunotherapy*. Cancers (Basel), 2011. **3**(4): p. 3856-93.
213. Zhang, B., et al., *IFN-gamma- and TNF-dependent bystander eradication of antigen-loss variants in established mouse cancers*. J Clin Invest, 2008. **118**(4): p. 1398-404.
214. Qin, Z., et al., *Inhibition of methylcholanthrene-induced carcinogenesis by an interferon gamma receptor-dependent foreign body reaction*. J Exp Med, 2002. **195**(11): p. 1479-90.
215. Mumberg, D., et al., *CD4(+) T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN-gamma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(15): p. 8633-8.
216. Coughlin, C.M., et al., *Tumor cell responses to IFNgamma affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis*. Immunity, 1998. **9**(1): p. 25-34.
217. Dighe, A.S., et al., *Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors*. Immunity, 1994. **1**(6): p. 447-56.
218. Kline, J., et al., *Cellular and molecular requirements for rejection of B16 melanoma in the setting of regulatory T cell depletion and homeostatic proliferation*. J Immunol, 2012. **188**(6): p. 2630-42.
219. Serafini, P. and V. Bronte, *Tumor-Induced Immune Suppression, Mechanisms and Therapeutic Reversal*. 2 ed. 2014, New York: Springer-Verlag
220. Youn, J.I., et al., *Epigenetic silencing of retinoblastoma gene regulates pathologic differentiation of myeloid cells in cancer*. Nat Immunol, 2013. **14**(3): p. 211-20.
221. Nishimura, T., et al., *Augmentation of the therapeutic efficacy of adoptive tumor immunotherapy by in vivo administration of slowly released recombinant interleukin 2*. Cancer Immunol Immunother, 1986. **21**(1): p. 12-8.
222. de Gruijl, T.D., et al., *Whole-cell cancer vaccination: from autologous to allogeneic tumor- and dendritic cell-based vaccines*. Cancer Immunol Immunother, 2008. **57**(10): p. 1569-77.
223. Machiels, J.P., et al., *Cyclophosphamide, doxorubicin, and paclitaxel enhance the antitumor immune response of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor-secreting whole-cell vaccines in HER-2/neu tolerized mice*. Cancer Res, 2001. **61**(9): p. 3689-97.
224. Ma, J., et al., *Anti-tumor T cell response and protective immunity in mice that received sublethal irradiation and immune reconstitution*. Eur J Immunol, 2003. **33**(8): p. 2123-32.
225. Fleming, V., et al., *Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cells to Bypass Tumor-Induced Immunosuppression*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 398.
226. Weed, D.T., et al., *Tadalafil reduces myeloid-derived suppressor cells and regulatory T cells and promotes tumor immunity in patients with head and neck squamous cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(1): p. 39-48.
227. Hassel, J.C., et al., *Tadalafil has biologic activity in human melanoma. Results of a pilot trial with Tadalafil in patients with metastatic Melanoma (TaMe)*. Oncoimmunology, 2017. **6**(9): p. e1326440.
228. Califano, J.A., et al., *Tadalafil augments tumor specific immunity in patients with head and neck squamous cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(1): p. 30-8.
229. Creelan, B.C., et al., *Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of oral omaveloxolone (RTA 408), a synthetic triterpenoid, in a first-in-human trial of patients with advanced solid tumors*. Onco Targets Ther, 2017. **10**: p. 4239-4250.
230. Condamine, T., et al., *Lectin-type oxidized LDL receptor-1 distinguishes population of human polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients*. Sci Immunol, 2016. **1**(2).
231. Nan, J., et al., *Endoplasmic reticulum stress induced LOX-1(+) CD15(+) polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma*. Immunology, 2018. **154**(1): p. 144-155.
232. Klages, K., et al., *Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells improves effective therapeutic vaccination against established melanoma*. Cancer Res, 2010. **70**(20): p. 7788-99.
233. Shitara, K. and H. Nishikawa, *Regulatory T cells: a potential target in cancer immunotherapy*. Ann N Y Acad Sci, 2018. **1417**(1): p. 104-115.

9. Anhänge

9.1 Abbildungsverzeichnis

| | | |
|----------|--|----|
| Abb. 1: | Immunoediting. Adaptiert aus [25]. | 13 |
| Abb. 2: | Interaktion zwischen Tumorzellen, Tumorstroma und MDSC. | 17 |
| Abb. 3: | LRAST-Grundbehandlungsschema mit Erweiterung um die MDSC-Depletion. | 39 |
| Abb. 4: | Aufbau und Strahlengang eines Durchflusszytometers am Beispiel des FACS-Calibur. | 40 |
| Abb. 5: | Darstellungsweise von FACS-Daten. | 42 |
| Abb. 6: | Schematische Auswertung durchflusszytometrischer Daten. | 43 |
| Abb. 7: | Gatingstrategie für T-Zellen und MDSC. | 45 |
| Abb. 8: | Schematische Darstellung eines Enzyme-linked-immunosorbent Assay. | 48 |
| Abb. 9: | Vitalitätsbestimmung rekonstituierter und wirtseigener Zellen. | 49 |
| Abb. 10: | Verhältnis CD45.1 ⁺ - zu CD45.2 ⁺ -Zellen. | 50 |
| Abb. 11: | Myeloide Zellen aus Milz und Blut nach LRAST-Behandlung. | 52 |
| Abb. 12: | Myeloide Zellen aus dem D5-Melanom am Tag 29/32 nach LRAST-Behandlung. | 53 |
| Abb. 13: | Depletion von PMN- und M-MDSC an Tag 2 und Tag 4. | 54 |
| Abb. 14: | Sekundärantikörperbindung der MDSC bis Tag 7. | 55 |
| Abb. 15: | Depletion von PMN- und M-MDSC im Langzeitverlauf. | 56 |
| Abb. 16: | Zeitachse für Lang- und Kurzzeitversuche. | 58 |
| Abb. 17: | Tumorspezifische IFN- γ -Freisetzung aus TVDLN. | 58 |
| Abb. 18: | Vergleich des Tumorwachstumsverhaltens für verschiedene Behandlungsgruppen. | 59 |

9.2 Tabellenverzeichnis

| | | |
|----------|---|----|
| Tab. 1: | Tumorzelllinien. | 27 |
| Tab. 2: | Verbrauchsmaterial für Zellkultur, Labor und Tierversuche. | 28 |
| Tab. 3: | Lösungen, Medien und biologische Reagenzien für die Zellkultur. | 29 |
| Tab. 4: | Sonstige Chemikalien. | 30 |
| Tab. 5: | Rezepturen für Lösungen und Puffer. | 30 |
| Tab. 6: | Zusätzliches für die Durchflusszytometrie. | 31 |
| Tab. 7: | Cytokine (IFN- γ) Release Assay und IFN- γ -ELISA. | 31 |
| Tab. 8: | Laborgeräte. | 32 |
| Tab. 9: | Primär- und Sekundärantikörper. | 33 |
| Tab. 10: | Isotyp-Kontrollen. | 34 |
| Tab. 11: | Antikörper für die MDSC-Depletion. | 35 |
| Tab. 12: | Markerprofile der untersuchten MDSC und T-Zellen. | 44 |

9.3 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------------|--|
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| 7-AAD | 7-Aminoactinomycin D |
| Abb. | Abbildung |
| ADAM | A Disintegrin And Metalloproteinase |
| Ag | Antigen |
| AJCC | American Joint Committee on Cancer |
| ANOVA | Analysis of variance |
| APC | Allophycocyanin |
| APC/Cy7 | Allophycocyanin (APC) + Indotricarbocyanine (Cy7) |
| APC | Antigenpräsentierende Zelle |
| Arg-1 | Arginase-1 |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| ATRA | All-trans retinoic acid |
| Bcl-xL | B-cell lymphoma extra large (Mitglied der Bcl-2 Familie) |
| BCG | Bacillus Calmette-Guerin |
| BD | Becton Dickinson |
| bFGF | Basic fibroblast growth factor |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| CCL | C-C-Motiv Chemokin-Ligand |
| CD | Cluster of differentiation |
| CDK4 | Cyclin Dependent Kinase 4 |
| CIK | Cytokine-induced killer cell |
| CO₂ | Kohlenstoffdioxid |
| COX-2 | Cyclooxygenase-2 |
| CRA | Cytokine Release Assay |
| CTL | Cytotoxic T lymphocyte |
| CTLA-4 | Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4 |
| CTX | Cyclophosphamid |
| CXCL | C-X-C-Motiv Chemokin-Ligand |
| DC | Dendritic Cell |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| EDTA | Ethylene Diamine Tetraacetic Acid |
| EGFR | Epidermal Growth Factor Receptor |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |

| | |
|-------------------------------------|--|
| EMT | Epithelial-Mesenchymale Transition |
| FACS | Fluorescence-activated Cell Sorting |
| FBS | Fetal Bovine Serum |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FOXP3 | Forkhead-Box-Protein P3 |
| FSC | Forward scatter |
| <i>x g</i> | x-Vielfaches der Erdbeschleunigung |
| G | Gauge |
| g | Gramm |
| (m) GM-CSF | (murines) Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor |
| G-MDSC | Granulozytäre MDSC |
| gp | Glycoprotein |
| HBSS | Hanks' Balanced Salt solution |
| HER2/neu | Human epidermal growth factor receptor 2 |
| HLA | Human leukocyte antigen |
| H₂O | Wasser |
| H₂O₂ | Wasserstoffperoxid |
| HBV | Hepatitis B - Virus |
| HPV | Humanes Papillomavirus |
| HRP | Horseradish peroxidase |
| H₂SO₄ | Schwefelsäure |
| HSV | Herpes-simplex Virus |
| IDO | Indolamin-2,3-Dioxygenase |
| IFA | Incomplete Freund's Adjuvant |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| iNOS | Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase |
| i.p. | intraperitoneal |
| i.v. | intravenös |
| JAK | Janus Kinase |
| KCl | Kaliumchlorid |
| KH₂PO₄ | Kaliumdihydrogenphosphat |
| l | Liter |
| LAK | Lymphokin-aktivierte Killerzellen |
| L-Glu | L-Glutamin |
| LPS | Lipopolysaccharid |

| | |
|--------------------------------------|---|
| LRAST | Lymphodepletion, Rekonstitution und Aktiv-Spezifische-Tumorthérapie |
| Ly6 (G/C) | Lymphocyte antigen 6 complex |
| M | Molar |
| MAGEA1 | Melanoma antigen family A 1 |
| mAk | monoklonaler Antikörper |
| MAPK | Mitogen-activated protein kinase |
| MART-1 | Melanoma Antigen Recognized by T cells 1 (= Protein Melan-A) |
| M-CSF | Macrophage colony-stimulating factor |
| MDSC | Myeloid-derived Suppressor Cells |
| Mg | Milligramm |
| MHC | Major Histocompatibility Complex |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimolar |
| M-MDSC | Monozytäre MDSC |
| MMP | Matrix-Metalloproteinase |
| MØ | Makrophage |
| MYC | MYC-Protoonkogen (von: Myelocytomatose) |
| MyD88 | Myeloid differentiation primary response gene 88 |
| NaCl | Natriumchlorid |
| Na₂CO₃ | Natriumcarbonat |
| NADPH | Reduziertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat |
| NaHCO₃ | Natriumhydrogencarbonat |
| Na₂HPO₄ | Natriumhydrogenphosphat |
| NaN₃ | Natriumazid |
| NaPyr | Natriumpyruvat |
| NEAA | Non-Essential Amino Acid |
| NF-κB | Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells |
| NH₄Cl | Ammoniumchlorid |
| NK | Natürliche Killer (-zelle) |
| NKG2D | Natural-Killer Group 2, member D |
| NKT | Natürliche Killer-T-Zelle |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NOS | Stickstoffmonoxid-Synthase |
| NOX-2 | NADPH-Oxidase-2 |
| NRF-2 | Nuclear factor erythroid 2-related factor |
| PAMP | Pathogen-associated molecular pattern |

| | |
|-------------------------------|---|
| PBS | Phosphate-Buffered Saline |
| PD | Programmed death receptor |
| PD-L | Programmed death receptor ligand |
| PE | Phycoerythrin |
| PerCP-Cy5.5 | Peridinin-chlorophyll-protein-complex-cyanine 5.5 |
| PGE2 | Prostaglandin E2 |
| pH | potentia Hydrogenii |
| PMN-MDSC | Polymorphonukleäre MDSC |
| PMT | Photomultiplier-Tube |
| RANK | Receptor Activator of NF- κ B |
| ROS | Reaktive Sauerstoffspezies |
| rpm | Rounds per minute |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute (Medium) |
| s.c. | Subkutan |
| SCF | Stem cell factor |
| SD | Standard Deviation (Standardabweichung) |
| SSC | Side scatter |
| STAT | Signal Transducer and Activator of Transcription |
| TCR | T cell receptor |
| TF | Transkriptionsfaktor |
| TGF-β | Transforming growth factor β |
| Th | T-Helfer |
| TIL | Tumordinfiltrierende Leukozyten |
| TLR | Toll-like receptor |
| TMB | Tetramethylbenzidin |
| TNF | Tumornekrosefaktor, Tumor necrosis factor |
| Treg | Regulatorische T-Zelle |
| TRP | Tyrosinase-Related protein |
| TVDLN | Tumorvakzine-drainierende Lymphknoten |
| TZR | T-Zell-Rezeptor |
| U | Unit |
| VEGF (R) | Vascular Endothelial Growth Factor (Receptor) |
| VSV | Vesicular stomatitis virus |
| WT | Wildtyp |

9.4 Danksagung

9.5 Eidesstattliche Versicherung



Eidesstattliche Versicherung

Rose, Peter, geb. 17.01.1989

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Die Auswirkung myeloider Suppressorzellen auf den Therapieerfolg einer aktiv-spezifischen Immuntherapie am Beispiel des malignen Melanoms

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Heidelberg, 14.02.2019 und Heidelberg, 19.11.2019

Ort, Datum

Peter Rose

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

9.6 Lebenslauf